

KN



S. 1/1, #6

PCT
 ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/29, 15/05, C07K 14/415, C12N 15/82, 5/10	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/50598 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 31. August 2000 (31.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00506 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Februar 2000 (18.02.00) (30) Prioritätsdaten: 199 07 598.0 22. Februar 1999 (22.02.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHULZ, Burkhard [DE/DE]; Eupener Strasse 16 a, D-50933 Köln (DE). (74) Anwalt: DEHMEL & BETTENHAUSEN; Müllerstrasse 1, D-80469 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: DNA SEQUENCE OF A PROTEIN THAT IS SIMILAR TO FKBP (54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ EINES FKBP ÄHNLICHEN PROTEINS (57) Abstract <p>The present invention relates to a nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 or the fragment or derivative thereof or a nucleic acid sequence which is hybridised with the nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7 and which is provided with the biological activity of the nucleic acid sequence according to SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7. The invention also relates to transgenic plants and the seeds thereof, whereby said plants comprise a recombinant inventive nucleic acid sequence.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäuresequenz gemäss SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 oder deren Fragment oder Derivat oder eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz gemäss SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 hybridisiert und die biologische Aktivität der Nukleinsäuresequenz gemäss SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 besitzt. Die Erfindung betrifft ferner transgene Pflanzen und deren Samen umfassend eine rekombinante erfindungsgemässe Nukleinsäuresequenz.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

DNA-Sequenz eines FKBP ähnlichen Proteins

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 oder deren Fragment oder Derivat oder eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 hybridisiert und die biologische Aktivität der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 besitzt. Die Erfindung betrifft ferner transgene Pflanzen und deren Samen umfassend eine rekombinante erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz.

- Die sessile Lebensweise von Pflanzen fordert eine hohe Anpassungsfähigkeit an die Umweltbedingungen des Standortes. Die endogenen Wachstums- und Entwicklungsprogramme müssen auf exogene Faktoren abgestimmt werden. Dies setzt die Perzeption von exogenen Faktoren voraus, die für die Pflanze lebenswichtig sind. Da der Perzeptionsort meist vom Ort der Reizantwort verschieden ist, muß eine inter- und intrazelluläre Signaltransduktion stattfinden. Obwohl in Pflanzen und Tieren Reize über unterschiedliche Rezeptoren wahrgenommen werden und zu andersartigen Reizantworten führen, bedienen sie sich oft gleicher Prinzipien zur Vermittlung von Signalen. G-Proteine, Calcium bzw. Calmodulin, Proteinkinasen und Proteinphosphatasen sind Elemente von Signaltransduktionsketten, die in Pflanzen und Tieren vorkommen. Der generelle Mechanismus der Signalvermittlung ist in vielen Fällen konserviert.

- Eine große Familie konservierter Proteine, über deren Funktionen bei der Signalvermittlung noch wenig bekannt ist, sind die Immunophiline (Schreiber, 1991, Science 251: 283-287). Die Immunophiline stellen eine Superfamilie dar, deren Mitglieder in Bakterien, Hefen, Pflanzen und Tieren zu finden sind. Sie sind in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert und an den verschiedenartigsten Prozessen zur Signalvermittlung beteiligt. Sie wurden als intrazelluläre Rezeptoren für immunsuppressive Substanzen in Säugetierzellen identifiziert (Handschumacher et al., 1984, Science 266: 544-547). Die Immunophiline lassen sich strukturell und durch ihre Affinität zu Immunsuppressiva in drei Klassen unterteilen: Cyclophiline, die CyclosporinA

binden, FK506 bindende Proteine, die FK506 oder Rapamycin binden und Parvuline, die keine Affinität gegenüber immunsupprimierenden Substanzen besitzen. CyclosporinA, FK506 und Rapamycin sind Substanzen, die von bodenbewohnenden Pilzen synthetisiert werden. Ihre Wirkung in Säugetieren ist die Unterdrückung der Immunantwort, was in der
5 Transplantationsmedizin genutzt wird, um die Abstoßungsreaktion gegen ein körperfremdes Organ zu mindern.

Die FK506-bindenden Proteine (FKBPs) werden ihrer Größe entsprechend eingeteilt. Das kleinste FKBP in Eukaryonten, FKBP12, ist ein relativ gut untersuchtes Immunophilin. Es
10 vermittelt in Abhängigkeit von der gebundenen immunsupprimierenden Substanz unterschiedliche Antworten (Bram et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13: 4760-4769; Brown et al., 1994, Nature 369: 756-758; Liu et al., 1991, Cell 66: 807-815). Die Bindung von FK506 an FKBP12 führt zur Komplexbildung mit der Calcium/Calmodulin abhängigen Proteinphosphatase Calzineurin.

15

Calzineurin ist an zahlreichen Signaltransduktionen beteiligt und seine Inhibierung durch den FKBP12-FK506-Komplex vermittelt u.a. die Unterdrückung der T-Zellaktivierung. Die Unterdrückung der Immunantwort durch FK506 wird anders als von Rapamycin über die Inaktivierung von Calzineurin vermittelt (Schreiber and Crabtree, 1992, Immunology Today
20 13:136-142). Im Komplex mit Rapamycin interagiert FKBP12 mit dem Protein mTOR (mammalian target of rapamycin). Eine Domäne des Proteins mTOR besitzt Sequenzhomologie zur katalytischen Domäne von Phosphatidylinositol-Kinasen (Sabatini et al., 1994, Cell 78: 35-43). Die Antwort, die FKBP12 mit Rapamycin vermittelt, führt in Interleukin-2 stimulierten T-Zellen zur Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus. In Abwesenheit von
25 immunsupprimierenden Substanzen interagiert FKBP12 mit Elementen anderer Signaltransduktionen, z.B. mit dem Rezeptor für den Transforming Growth Factor- β (TGF- β Rezeptor) und moduliert seine Funktion bei der Zellzykluskontrolle (Wang et al., 1994, Science 265: 674-676). FKBP12 ist desweiteren an der Regulation zweier intrazellulärer Calciumkanäle beteiligt, nämlich des Inositol-1,4,5-triphosphatrezeptors und des Ryanodinrezeptors (Brillantes
30 et al., 1994; Cameron et al., 1995, Cell 83: 463-472). FK506 oder Rapamycin führte zur Dissoziation von FKBP12 und Calzineurin von den Calciumkanalkomplexen und darüber zu einem erhöhten Calcium-Efflux durch diese Kanäle. Die Regulation der Calciumkanäle durch FKBP12 konnte anhand von Untersuchungen einer transgenen Mausmutante, die kein

funktionelles FKBP12 exprimiert, bestätigt werden (Shou et al., 1998, Nature 391: 489-492). FKBP12-defiziente Mäuse starben vor oder kurz nach der Geburt an einer Herzmuskelschwäche, die auch bei Patienten beobachtet wurde, die mit FK506 behandelt wurden. Die Calcium-Leitfähigkeit der Ryanodinrezeptoren in Skelettmuskeln dieser Mäuse glich der eines gereinigten
5 Rezeptors ohne gebundenes FKBP12.

FKBP59 aus Säugetieren wurde als essentielle Komponente von nicht an Liganden gebundene Steroidrezeptorkomplexe identifiziert (Sanchez et al., 1990, Biochemistry 29: 5145-5152). In diesem Multiproteinkomplex sind ebenfalls zwei Hitzeschock-Proteine, Hsp70 und Hsp90,
10 identifiziert worden. Die Bindung von FKBP59 an den Steroidrezeptor erfolgt indirekt über Hsp90 (Peattie et al., 1992). Die Interaktion von FKBP59 und Hsp90 wird von einem konservierten Protein-Protein-Interaktionsmotiv, den sogenannten Tetratricopeptid-Wiederholungen (TPR) vermittelt. Das TPR-Motiv ist eine 34-Aminosäuresequenz, die ursprünglich in Proteinen gefunden wurde, die bei der Zellzyklusregulation, der
15 Transkriptionsregulation, dem Proteintransport und an der Hitzeschockantwort beteiligt sind (Goebel and Yanagida, 1991, TIBS 16: 173-177). Die TPR-Domäne des Typs III besteht aus der dreimaligen Wiederholung des TPR-Motivs, wobei zwei der Wiederholungen direkt aufeinanderfolgen. Der Abstand zum ersten TPR-Motiv ist konserviert und beträgt 10-16 Aminosäuren. Die Sequenzmotive bilden amphipatische α -Helices, die als "knob-hole"-Struktur
20 bezeichnet wurden und eine spezifische Protein-Protein-Interaktion vermitteln können.

Die Bindung eines Steroidhormons an den Rezeptorkomplex führt zur Dissoziation von FKBP59 und Hsp90. Der ligandengebundene Steroidrezeptor kann nun in den Kern gelangen und ist an DNA gebunden am Aufbau eines Transkriptionkomplexes beteiligt. Es wird diskutiert, daß
25 FKBP59 und die Hsp-Proteine zur Erhaltung der Konformation des nicht Liganden-gebundenen Steroidrezeptors benötigt werden (Pratt and Welsh, 1994, Sem. Cell Biol. 5: 83-93).

Vor wenigen Jahren wurden Immunophiline aus Pflanzenextrakten von *Vicia faba* über ihre Affinität zu FK506 und CyclosporinA isoliert (Luan et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:
30 984-988). Dabei wurde auch ein FKBP12 isoliert, das hohe Sequenzhomologie zu FKBP12 aus Hefen und Tieren zeigt (zwischen 47%-51% Aminosäuresequenzidentität). *In vitro* zeigte dieses FKBP12 aus *Vicia faba* jedoch nur geringe Affinität zu Calzineurin, und in Hefen exprimiert vermittelte es nicht die Wirkung von FK506 und Rapamycin (Xu et al., 1998, Plant J. 15: 511-

519). In *Vicia faba* konnte injiziertes FK506 eine Calcium-abhängige Regulation von Kaliumkanälen in Schließzellen nur dann inhibieren, wenn humanes FKBP12 ebenfalls exogen verabreicht wurde (Luan et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2202-2206), was ein Hinweis auf das Vorhandensein einer FKBP12-FK506 Signaltransduktionskette in Pflanzenzellen ist, ohne daß ein endogener Rezeptor für FK506 vorliegt.

In der Pflanzenzüchtung wird seit langer Zeit versucht, gewünschte Eigenschaften von Nutz- und Zierpflanzen zu verbessern. Bisher sind diese Verbesserungen durch sehr langfristige und kostenintensive Methoden der konventionellen Züchtung erzielt worden. Allerdings dauert die Entwicklung von neuen Pflanzensorten und Produkten oft 10 bis 15 Jahre. Eine alternative Strategie besteht darin, durch Nutzung genetischer Information wie „Marker gestützte Züchtung“ und gentechnische Veränderungen, gezielt Pflanzen mit einer Verbesserung gewünschter Eigenschaften für Nutz- und Zierpflanzen bereitzustellen. Ein gewünschter Aspekt ist dabei die Erhöhung des Ertrags durch die Vergrößerung der Zahl oder des Volumens von erntebaren Samen (1000 Korn-Gewicht), die bei vielen Nutzpflanzen die ertragsbestimmenden Organe darstellen. Hierbei ist jedoch nicht nur die Vergrößerung der Parameter Zahl und Volumen gewünschtes Ziel, sondern auch die Vermeidung von Samenverlusten durch Samenfall vor der Ernte und die Reduzierung von Druschverlusten während der Ernte. Während der Samenreife, nach der Füllung der Samen mit Speicherstoffen, wird die Phase der Samenruhe eingeleitet. Diese Entwicklungsphase ist durch Trocknung der Samen-tragenden Organe z.B. Schoten oder andere Öffnungsfrüchte gekennzeichnet. Die Schoten platzen im Laufe dieser Phase entlang der Nähte des Organs auf, um die Verbreitung der Samen zu gewährleisten. In produktionstechnischer Hinsicht ist dieser für die Verbreitung der generativen Organe einer Pflanze wichtige Vorgang nicht erwünscht. Samen, die vor Beginn der Ernte durch Wettereinflüsse wie Niederschlag oder Wind aus den Früchten gelöst werden, als auch Samen, die durch die mechanischen Manipulationen während des Erntevorgangs zu Boden fallen, müssen als Ernteverlust gewertet werden.

Die Veränderung der Gesamtarchitektur einer Pflanze mit dem Ziel der Reduktion des Sproßwachstums ist für Nutzpflanzen, deren Ertrag durch erntebare Fortpflanzungsorgane bestimmt wird, seit langer Zeit erklärtes Ziel der Züchtung. Zum einen besteht hierbei die Möglichkeit der Verschiebung der Verhältnisse der Biomasse von nicht ertragsrelevanten vegetativen Bereichen der Pflanze in ertragsbestimmende Ernteorganen. Zum anderen wird durch

die Verkürzung von Sproßbereichen die Festigkeit der Pflanze gegenüber Witterungseinflüssen erhöht. Diese Aspekte sind besonders bei der Züchtung von Getreidepflanzen von großer Wichtigkeit, da ein relevanter Teil des Ertragsverlustes durch Halmbruch (lodging) vor der Ernte ausgemacht wird. Der Ertrag von Getreiden ist in den letzten 50 Jahren erheblich gesteigert worden, wobei Zwergwuchs vermittelnde Mutationen, wie beispielsweise Rht1, Rht2, Rht3 in Weizen oder D8 und D9 in Mais, die in kommerziell genutzte Sorten eingekreuzt wurden, einen erheblichen Anteil an dieser Ertragssteigerung haben. Das Ergebnis dieser züchterischen Arbeit waren Linien, die bei Zugabe von Kunstdünger nicht mit Verlängerung des Halms, sondern mit der Erhöhung des Samenertrags reagierten (Silverstone und Sun, Trends in Plant Science 5: 1-2 (2000)).

Ein verringerter Wuchs ist auch bei Zierpflanzen oft erwünscht. Hier ist besonders auf die Erzeugung von Bonsaigewächsen als auch verkleinerter Versionen vieler Zierpflanzen und Schnittblumen z.B. Sonnenblumen hingewiesen. In diesem Zusammenhang kann auch der verdrehte Wuchs wieder von Interesse sein, da Strauch- und Baumgewächse mit verdrehtem Wuchs z.B. Korkenzieherweiden oder Ficus im Zierpflanzenangebot zu finden sind. Bei der Produktion von Nutzholz kann ein verdrehtes Wachstum des Sproßes und der Verzweigungen erwünschte Eigenschaften hervorrufen. Bei Bäumen lässt sich einerseits durch Bildung von sogenanntem "Kompressionsholz" Holz mit veränderten Festigkeitseigenschaften und veränderten Erträgen gewinnen. Hierbei werden von Pflanzen mit stark lignifizierten Sproßorganen bei Veränderungen der vorgegebenen Wachstumsrichtung zur Entlastung von mechanischen Streß erhöhte Mengen an Kompressionsholz gebildet. Diese Eigenschaft kann bei der Produktion von Holz für die Papierherstellung genutzt werden. Holz, das als Bauholz oder zur Herstellung von Möbeln verwendet wird, kann durch verdrehtes Wachstum der erntebaren Sproßbereiche mit veränderter Festigkeit produziert werden, da hierbei Druck- und Zugfestigkeitseigenschaften der Sproßbereiche verändert sind. Fasern produzierende Pflanzen können durch das verdrehte Wachstum Pflanzenfasern mit neuen, erwünschten Eigenschaften der Verarbeitung und physikalischen Eigenschaften (Festigkeit etc.) hervorbringen.

Die hier genannten Aufgaben werden durch den Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Figur 1 zeigt die genomische Sequenz des twisted dwarf Gens aus *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Wassilewskija, einschließlich des Promoterbereichs. Das Start- und Stop-Codon sind unterstrichen dargestellt. Exonsequenzen sind durch Fettdruck gekennzeichnet, Intronsequenzen sind kursiv gedruckt. Am Zeilenbeginn der Nukleotidsequenz sind die durchnummerierten

5 Positionen angegeben. In den Zeilen unter der Nukleotidsequenz ist jeweils die Aminosäuresequenz des offenen Leserasters angegeben. Aminosäurepositionen sind am Zeilenende nummeriert.

Figur 2 zeigt eine Darstellung des Aminosäurevergleichs des twd-Gens aus *Arabidopsis thaliana* (TWD) und *Lycopersicon esculentum* (TTP). Identische Aminosäuren sind durch einen senkrechten Strich, ähnliche Aminosäuren durch zwei Punkte verbunden.

10

Figur 3 zeigt eine Darstellung des Aminosäurevergleichs des twd-Gens aus *Arabidopsis thaliana* (TWD) und *Zea mays* (ZmTWD). Identische Aminosäuren sind durch einen senkrechten Strich,

15 ähnliche Aminosäuren durch zwei Punkte verbunden.

Der hier verwendete Ausdruck "Vektor" bezeichnet natürlich vorkommende oder künstlich hergestellte Konstrukte zur Aufnahme, Vermehrung, Expression oder Übertragung von Nukleinsäuren, z.B. Plasmide, Phagemide, Cosmide, künstliche Chromosomen, Bakteriophagen,

20 Viren, Retroviren.

Der hier verwendete Ausdruck "Derivate" bezeichnet Nukleinsäuresequenzen oder Aminosäuresequenzen, die eine oder mehrere Modifikationen wie Deletionen, Substitutionen, Additionen, Insertionen und/oder Inversionen aufweisen.

25

Der hier verwendete Ausdruck "Fragmente" bezeichnet Nukleinsäuresequenzen oder Aminosäuresequenzen, die einen Teilbereich der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Aminosäuresequenzen umfassen.

Der hier verwendete Ausdruck "transformierte Pflanzenzelle" bezeichnet Pflanzenzellen und aus ihnen hervorgegangene Pflanzen oder Pflanzenorgane, die durch Übertragung von Nukleinsäuren z.B. Plasmide, Phagemide, Cosmide, künstliche Chromosomen, Bakteriophagen, Viren, Retroviren oder Nukleinsäuresequenzen, die nicht in Vektorkonstrukte gefaßt wurden, genetisch

30

verändert wurden.

Der hier verwendete Ausdruck "Steuerelemente" bezeichnet Nukleinsäuresequenzen, die für die Regulation der Expression eines Gens dienen. Diese Nukleinsäuresequenzen beeinhalt
5 Promotorbereiche eines Gens, als auch regulatorische Bereiche innerhalb der translatierten wie nicht-translatierten Regionen eines Gens.

Der hier verwendete Ausdruck "Hybridisierung oder "hybridisieren" bedeutet stringente und weniger stringente Bedingungen; vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour
10 Laboratory (1989), ISBN 0-87969-309-6. Ein Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen ist: Hybridisierung in 4 x SSC bei 65° C (alternativ in 50% Formamid und 4 X SSC bei 42° C), gefolgt von mehreren Waschschr
15 Hybridisierung in 4 x SSC bei 37° C, gefolgt von mehreren Waschschr
Raumtemperatur.

Der hier verwendete Ausdruck "homologe Sequenz" oder "homolog" bezeichnet eine Nukleinsäure- oder Proteinsequenz, die die Aktivität der Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 aufweisen. Als
20 homologe Sequenzen gelten ferner Nukleinsäuresequenzen, die mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 oder Teilen dieser Sequenzen unter stringenten oder wenig stringenten Bedingungen hybridisieren. Als homologe Sequenzen sollen des weiteren Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen oder Teile davon gelten, die unter Zuhilfenahme des Similaritätsalgorithmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool,
25 Altschul et al., Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990) (Matrix: Blosom 62, Gap existence cost: 11, Per residue gap cost:1) eine signifikante Ähnlichkeit mit den Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen der vorliegenden Erfindung aufweisen. Als signifikant ähnlich werden, wie hier verwendet, Sequenzen bezeichnet, die z.B. unter Verwendung von Standardparametern im Blast-Service des NCBI ein Signifikanzniveau (Probability) von $P < 1e^{-30}$
30 aufweisen, wenn Sie mit den Sequenzen gemäß SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 oder Teilen davon verglichen werden.

Der hier verwendete Ausdruck „Marker gestützte Züchtung“ bezeichnet die Selektion von

Pflanzen unter Verwendung genetischer Informationen und davon abgeleiteten molekularen Markern wie AFLP, RFLP, SNP etc. in Züchtungsprogrammen. Die erwähnten molekularen Marker repräsentieren alle Arten von Nukleinsäuresequenzveränderungen, die über diagnostische DNA-Analysen wie PCR, Restriktionsanalyse oder Hybridisierung nachgewiesen und zur
5 Durchmusterung von Pflanzenpopulationen benutzt werden können.

Aus einer Population von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die durch T-DNA Insertion mutagenisiert wurden, konnte eine Mutante isoliert werden, die sich durch drastische Veränderung ihres Phänotyps auszeichnet. Die twisted dwarf-Mutante (im Nachfolgenden *twd*
10 genannt) besitzt einen pleiotropen Phänotyp, dessen Ausprägung sich in der Pflanzenarchitektur und der Physiologie manifestiert. Die *twd*-Mutante ist in ihrer Gesamtgröße stark reduziert, zum Zeitpunkt der Seneszenz erreicht sie nur ein Drittel der Wildtyp-Gesamtgröße (ca. 25 cm). Die Mutante ist wie auch andere *Arabidopsis*-Zwergmutanten dunkler grün und wirkt aufgrund der verkürzten Infloreszenzen kompakt. Das Wachstum der Rosettenblätter zeichnet sich durch
15 extrem epinastische Krümmung und eine unregelmäßige Oberfläche aus. An ausgebreiteten Rosettenblätter ist zu erkennen, daß das Verhältnis von Blattlänge zur Blattspreite kleiner ist als bei Wildtyp-Rosettenblättern. Die stark verkürzte Sproßachse der Infloreszenz besitzt einen größeren Durchmesser als Wildtyp-Pflanzen. Das desorientierte Wachstum der Sproßachse gibt der Mutante ein für *Arabidopsis thaliana* ungewöhnliches Aussehen, das an eine Rankenpflanze
20 erinnert. Das desorientierte Wachstum der Pflanzenorgane ist auch in den Staubblättern und im Fruchtknoten zu beobachten.

Die DNA-Sequenzen des mutierten Gens wurden über die Methode des Plasmid-Rescue in *E.coli* aus der Mutante isoliert. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, daß die zur Mutagenese
25 verwendete T-DNA zwei Sequenzbereiche enthält, die Replikation und Selektion in *E.coli*-Zellen ermöglichen. Durch Spaltung von genomischer DNA der *twd*-Mutante mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (hier EcoRI) wurden DNA-Fragmente erzeugt, die nach Selbstligation in transformationskompetente *E.coli*-Zellen eingebracht wurden. Die Selektion Plasmid-tragender Klone erfolgte über Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin auf festen
30 Nährmedien. Von diesen Klonen wurden DNA der transformierten Plasmide isoliert und über Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und nachfolgender Hybridisierung mit Hybridisierungsproben der verwendeten T-DNA-Klone identifiziert, die neben T-DNA-Sequenzen auch DNA-Sequenzen des mutierten *twd*-Locus enthielten. Diese DNA-Sequenzen

wurden isoliert und in den Vektor pBluescript(SK-)® (Stratagene, USA) subkloniert. Die inserierten DNS-Sequenzen wurden mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Zur nachfolgenden Isolierung von genomischen und cDNA-Klonen des *twisted dwarf*-Gens aus Genbibliotheken wurden die klonierten DNA-Sequenzen als Hybridisierungs sonden verwendet.

5

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 oder deren Fragment oder Derivat oder eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 hybridisiert und die biologische Aktivität der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 besitzt. Ferner betrifft die Erfindung eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 stellt die genomische DNA-Sequenz, die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 die cDNA-Sequenz des *twisted dwarf*-Gens aus *Arabidopsis thaliana*, SEQ ID NO:5 ein Fragment der cDNA-Sequenz des homologen *twisted dwarf*-Gens aus *Lycopersicon esculentum*, SEQ ID NO:7 ein Fragment der cDNA-Sequenz des homologen *twisted dwarf*-Gens aus *Zea mays* dar.

10

15

Ferner betrifft die Erfindung ein Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:8. Die Aminosäuresequenz kann modifiziert sein, so daß die Aminosäuresequenz an einer oder mehreren Positionen Aminosäure-Additionen, -Deletionen oder -Insertionen aufweist. Die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:3 stellt die Aminosäuresequenz des *twisted dwarf*-Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, SEQ ID NO:6 die Aminosäuresequenz des Homologen *twisted dwarf*-Proteins aus *Lycopersicon esculentum*, SEQ ID NO:8 die Aminosäuresequenz des Homologen *twisted dwarf*-Proteins aus *Zea mays* dar.

20

25

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen aus einem pflanzlichen Genom, insbesondere bevorzugt aus *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* oder *Lycopersicon esculentum*, die die Kodierregion eines FKBP-ähnlichen (FK506 bindendes Protein) Gens (*twisted dwarf*) enthalten, deren Aktivität die Ausprägung der Gesamtarchitektur der Pflanze insbes. Zellwachstum, Wachstumsorientierung, Verzweigungsgrad, etc. kontrolliert. Der Ausfall dieser Aktivität z.B. durch Mutation oder Deletion in einem pflanzlichen Genom führt zur Veränderung der Gesamtarchitektur der Pflanze durch Verringerung des Zellwachstums, Desorientierung des

30

Wachstums aller überirdischen wie unterirdischen Organe, Verringerung des Verzweigungsgrads des Sproßes, Veränderungen in der Reaktion auf Brassinosteroide und deren Vorstufen und Derivate, und die Veränderung der Reaktion der Wurzel auf gravitrope Reize durch die Veränderung von Ethylenproduktion und Ethylen-induzierte Signalweiterleitung. Die
5 erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kann in einen Vektor eingefügt werden, der zusätzlich ein oder mehrere Steuerelemente umfasst, die die Transkription und/oder Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz steuern. Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, z.B. Plasmide, und Wirtszellen, z.B. Hefen und Bakterien, umfassend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz.

10

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz zur Identifizierung und Isolierung homologer oder verwandter FKBP ähnlicher Gene und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz aus anderen dikotylen und monokotylen Pflanzen durch Datenbankvergleiche, Hybridisierung oder durch PCR-Techniken, die allesamt dem Fachmann
15 bekannt sind.

20

Zum Auffinden von homologen oder verwandten FKBP ähnlichen Genen aus anderen Pflanzen mittels eines Datenbankvergleichs können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder die davon abgeleiteten erfindungsgemäßen Polypeptidsequenzen in Datenbankvergleichen mit dem Similaritätsalgorithmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al., Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990), blastn für Vergleiche mit Nukleinsäuresequenzen, tblastn für Vergleiche mit Polypeptidsequenzen) unter Verwendung von Standardparametern im Blast-Service des NCBI eingesetzt. Hierbei werden Gensequenzen mit einem Signifikanzniveau von $P < 1e^{-30}$, die auch eine ähnliche Domänenstruktur wie die
25 erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder die davon abgeleiteten Polypeptidsequenzen aufweisen, als homolog oder verwandt zum twd-Gen bezeichnet.

30

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen, umfassend das stabile Integrieren mindestens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzengeweben und Regeneration der erhaltenen Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu Pflanzen. Bevorzugt betrifft die Erfindung ein Verfahren, wobei die integrierte Nukleinsäuresequenz ferner ein oder mehrere Steuerelemente umfasst, die die Transkription und/oder Translation der Nukleinsäuresequenz gewährleisten. Besonders

bevorzugt betrifft die Erfindung ein Verfahren, wobei die integrierte Nukleinsäuresequenz in Antisense-Orientierung exprimiert wird. Ferner besonders bevorzugt betrifft die Erfindung ein Verfahren, wobei die integrierte Nukleinsäuresequenz die Aktivität eines Ribozyms besitzt, das die biologische Aktivität der endogenen Nukleinsäuresequenz unterdrückt, die ein FKBP
5 ähnliches Protein kodiert. Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz und gegebenenfalls ihre Steuerelemente können über homologe Rekombination in die genomische DNA der Zielzellen integriert werden. Die homologe Rekombination kann ferner so durchgeführt werden, daß die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz in den genomischen Bereich des endogenen Gens, das ein FKBP ähnliches Protein kodiert, integriert wird.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dabei nicht auf eine bestimmte Pflanzenart begrenzt, sondern kann in allen Pflanzen angewendet werden. Bevorzugte Pflanzen sind z.B. Nutz- oder Zierpflanzen z.B. Getreide wie Weizen, Mais, Reis, Roggen oder Gerste, Leguminosen wie Erbse, Bohne, Kichererbse, Linsen oder Sojabohne, Brassicaceen wie Raps oder Senf,
15 Faserpflanzen wie Flachs, Hanf oder Baumwolle, Bäume wie Fichte, Pappel, Buche, Eiche oder Nußholz, Ziersträucher, oder Nachtschattengewächse wie Tomate oder Kartoffel.

Die Erfindung betrifft ferner transformierte Pflanzenzellen oder transformiertes Pflanzengewebe, umfassend eine stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder des Pflanzengewebes integrierte
20 erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz. Bevorzugt sind transformierte Pflanzenzellen oder transformiertes Pflanzengewebe, die zu einer Samen-produzierenden Pflanze regenerierbar sind. Die Erfindung betrifft ferner transgene Pflanzen und deren Samen umfassend eine rekombinante erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz.

25 Die Erfindung betrifft ferner Mutanten z.B. in *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* oder *Lycopersicon esculentum*, in denen die endogene twisted dwarf DNA-Sequenz (FKBP-ähnliches (FK506 bindendes Protein) Gen) z.B. durch T-DNA Insertion oder durch Deletion oder Insertion verschieden großer DNA-Bereiche verändert wurde und die erwähnten phänotypischen Veränderungen aufweisen. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, bei denen mutierte
30 DNA-Sequenzen der angegebenen Gensequenz durch Einführung intakter Genkopien phänotypisch zum Wildtyp restauriert wurden.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. das erfindungsgemäße Verfahren kann verwendet werden, um transgene Pflanzen mit einem veränderten, d.h. desorientierten, Wachstum herzustellen. Das desorientierte Wachstum manifestiert sich in einer Veränderung der Struktur von Zellwänden und intrazellulären Stütz- und Formelementen (z. B. Cytoskelett).

- 5 Solche Veränderungen können für die Herstellung von Pflanzen verwendet werden, die zur Produktion von Faserstoffen und anderen Materialien verwendet werden, die neue, veränderte Materialeigenschaften haben. Durch das verdrehte Wachstum von lignifizierten Stützorganen z.B. bei Bäumen lässt sich auf der einen Seite durch Bildung von sogenanntem "Kompressionsholz" Holz mit veränderten Festigkeitseigenschaften und eventuell veränderten
- 10 Erträgen gewinnen. Fasern produzierende Pflanzen können durch das verdrehte Wachstum Pflanzenfasern mit neuen, erwünschten Eigenschaften der Verarbeitung und physikalischen Eigenschaften (Festigkeit etc.) hervorbringen.

- Ein weiterer Aspekt des verdrehten Wachstums betrifft die Verdrehung der Wachstumsrichtung um die Längsachse von Öffnungsfrüchten z.B. Schoten von Nutzpflanzen. Dieses Wachstum hat
- 15 ein reduziertes spontanes Aufplatzen der Öffnungsfrüchte zum Zeitpunkt der Samenreife zur Folge. Zum Zeitpunkt der Samenreife, nach der Füllung der Samen mit Speicherstoffen, wird die Phase der Samenruhe eingeleitet, die durch Trocknung und Aufplatzen der Öffnungsfrüchte zur Verbreitung der Samen gekennzeichnet ist. Ein verdrehtes Wachstum der Öffnungsfrüchte z.B.
- 20 Schoten verhindert die vollständige Öffnung der Schote und führt somit zu reduziertem Samenfall. Hiermit werden Druschverluste bei der mechanischen Manipulation während des Erntevorgangs und Ernteverluste durch ungewollten vorzeitigen Samenfall reduziert. Diese Eigenschaften sind besonders bei allen Nutzpflanzen mit erntebaren Öffnungsfrüchten z.B. Soja, Raps, Senf oder Leguminosen aller Art nützlich.

25

- Es konnte ferner gezeigt werden, daß die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz nicht nur für die Wachstumsrichtung sondern auch für die Größe der Pflanze an sich verantwortlich ist. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch transgene Pflanzen, die einen verkleinerten Habitus gegenüber ihren Wildtyp-Pflanzen besitzen. Zum einen gilt das für alle Getreide wie
- 30 beispielsweise Weizen, Mais, Reis, Roggen, Gerste etc., die durch Halmverkürzung zum einen höhere Stabilität während des Wachstums und der Ernte und damit verringerten Halmbruch z.B. bei Niederschlägen und Wind, als auch eine höhere Produktion von Biomasse in den erntebaren Organen aufweisen. Ferner ist verringerter Wuchs auch bei Zierpflanzen oft erwünscht. Hier ist besonders auf die Erzeugung von Bonsaigewächsen als auch verkleinerter Versionen vieler

Zierpflanzen und Schnittblumen z.B. Sonnenblumen hingewiesen. In diesem Zusammenhang kann auch der verdrehte Wuchs zusätzlich von Interesse sein, da Strauch- und Baumgewächse mit verdrehtem Wuchs z.B. Korkenzieherweiden oder Ficus im Zierpflanzenangebot zu finden sind.

5

Die Schote ist, wie die Blüte, in ihrer Gesamtlänge geringer reduziert als die übrigen Organe, der Blütenstil ist jedoch stark verkürzt. Die Samen der twisted dwarf-Mutante zeigen auffälligerweise nicht die starke Größenreduzierung der anderen Pflanzenorgane. Im Vergleich zu Wildtypsamen ist bei Samen von twisted dwarf Mutanten sogar ein größeres Volumen festzustellen. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung somit eine Erhöhung des Gesamterntegewichts von samentragenden Pflanzen. So konnte gezeigt werden, daß die durchschnittliche Anzahl der Samen pro Schote bei twd-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (20) auf ca. ein Drittel der Anzahl einer entsprechenden Wildtyp-Pflanze (57) reduziert ist. Die Zahl der Schoten an einer Pflanze war jedoch bei twd-Mutanten (417) gegenüber dem Wildtyp (136) erheblich erhöht. Daher ergibt sich für die durchschnittliche Gesamtzahl an geernteten Samen pro Pflanze für twd-Mutanten ein um ca. 10% erhöhter Ertrag an Samen. Die Dimensionen der Samen zeigen bei twd-Mutanten und entsprechenden Wildtyp-Pflanzen ebenfalls erhebliche Unterschiede. Abschätzungen der Samenvolumina nach Leon-Klosterziel et al., Plant Cell 6: 385-392 (1994) zeigen für Samen von twd-Pflanzen ein um ca. 50% vergrößertes Volumen. Diese Eigenschaften sind besonders bei allen Nutzpflanzen mit erntebaren Schoten z.B. Soja, Raps, Senf oder Leguminosen aller Art nützlich.

Unabhängig von der unterschiedlich ausgeprägten Größenreduktion einzelner Pflanzenorgane ist das unregelmäßige und desorientierte Wachstum in allen Pflanzenorganen einschließlich der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* beobachtet worden. Die twisted dwarf-Mutation führt neben Veränderungen des Wachstums auch zu einer verlangsamten Entwicklung der Pflanze. Dies zeigt sich in einem verlängertem Lebenszyklus der twisted dwarf-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Nach etwa 6 Wochen unter Langtagbedingungen (Lichtphase mind. 16 Stunden) setzt die Seneszenz beim Wildtyp ein. Der Lebenszyklus der twisted dwarf Mutante ist unter Langtagbedingungen um etwa eine Woche verlängert, unter Kurztagbedingungen (Lichtphase maximal 9 Stunden) sind es ca. drei Wochen. Durch den Defekt im twd-Gen ist eine Verlängerung der vegetativen Lebensphase um 5 Tage (ca. 20% längere vegetative Phase) der Mutanten zu beobachten. Dieser Umstand lässt sich für die Produktion von Pflanzen ausnutzen,

bei denen eine Verzögerung des Eintretens in die generative Phase und ein verzögertes Eintreten der Seneszenz gewünscht ist, z.B. bei Zierpflanzen.

Die verminderte Gesamtgröße der twisted dwarf-Mutante ist durch eine Verkürzung der Zellen verursacht. Epidermiszellen von primären Infloreszenzen des Wildtyps und der twisted dwarf-Mutante, die mit einer Pinzette abgelöst und anschließend mit Safranin-Rot angefärbt wurden, zeigen eine Verkürzung der Zellen aus der twisted dwarf Mutante auf ca. 33%. Sprühversuche von auf Erde wachsenden twisted dwarf-Mutanten mit 10^{-7} M des Brassinosteroids Brassinolid zeigten ein verstärktes Streckungswachstum gegenüber Kontrollexperimenten. Wurden jedoch Doppelmutanten von twisted dwarf und der Campesterol-Reduktase-Mutante det2, die eine Zwergmutante von *Arabidopsis thaliana* darstellt, die durch exogene Applikation von Brassinosteroiden zum Wildtyp komplementiert werden kann, mit 10^{-7} M Brassinolid gesprüht, war bei diesen Pflanzen, die extremen Zwergwuchs aufweisen, keinerlei Reaktion auf die Brassinolidgaben festzustellen. Dieses Ergebnis zeigt daher, daß es sich bei der twisted dwarf-Mutante um eine Pflanze handelt, die an der Rezeption oder der Signalweiterleitung der Brassinosteroidantwort in Pflanzen beteiligt ist. Zum einen lassen sich durch Herstellung solcher Mutanten, Pflanzen mit reduzierten Wuchs als Zierpflanzen oder andere Nutzpflanzen gezielt herstellen. Zum anderen können solche Pflanzen als Modelle zur Untersuchung der Steroidhormonwirkung verwendet werden.

Die offensichtliche Beteiligung an der Brassinosteroid-Signalrezeption und -Signalverarbeitung des TWD-Genprodukts ermöglicht es, Pflanzen zu erzeugen, die durch Veränderung des TWD-Genprodukts selbst oder der Menge an TWD-Genprodukt, über die Reaktion gegenüber dem Pflanzenwuchsstoff Brassinosteroid und seinen Derivaten in Habitus, Lebenszyklus, Ertrag etc. beeinflussbar sind. Es ist dadurch auch möglich, Modellsysteme für Untersuchungen der Wirkweise von Brassinosteroid und seinen Derivaten in Nutzpflanzen zu schaffen, die zur Entwicklung von spezifischen Wuchsstoffen und Effektoren führen.

Das desorientierte Wachstum der twisted dwarf-Mutante führte zu der Frage, ob die Mutante in der Lage ist ein gerichtetes, asymmetrisches Wachstum als Reaktion auf einen unidirektionalen Reiz (Tropismus) auszuführen. Die oberirdischen Pflanzenorgane reagierten wie der Wildtyp mit positivem Phototropismus und mit negativem Gravitropismus. Der Wurzelgravitropismus der Mutante twisted dwarf und des Wildtyps wurde anhand der Anzucht von Keimlingen auf vertikal

positionierten Agarplatten verfolgt. Die vertikale Umorientierung der Platten nach 7 Tagen um 90° führte zu einer Änderung der Wachstumsrichtung deren Winkel nach weiteren 5 Tagen gemessen wurde. Ein Krümmungswinkel zwischen 80°-100° wurde als gravitrop definiert (Yamamoto and Yamamoto, 1998, Plant Cell Physiol. 39: 660-664). Von Keimlingen der Mutante twisted dwarf zeigten nur 27% der Wurzeln ein gravitropes Wachstum. Die restlichen 73% zeigten ein agravitropes Wachstums. Die Wurzeln von Wildtyp-Keimlingen führten alle eine Änderung der Wachstumsrichtung um ca. 90° aus, was einem positiv-gravitropen Wachstum entspricht. Ein agravitropes Wurzelwachstum wurde auch in den Mutanten eirl (Luschnig et al., 1998, Genes Dev. 12: 2175-2187) und aux1 (Maher and Martindale, 1980, Biochem. Genet. 18: 1041-1053) beobachtet. Diese Mutanten sind exogenen Applikationen von Ethylen gegenüber insensitiv. Um die Ethylensensitivität der twisted dwarf-Mutante zu untersuchen, wurden Keimlinge unter den gleichen Bedingungen wie für die Kontrolle beschrieben inkubiert, nur wurden der Luft 10 ppm Ethylen zugesetzt. Zunächst wurde die twisted dwarf-Mutante auf ihren Phänotyp hin untersucht. Die erhöhte Ethylenkonzentration verursachte phänotypische Veränderungen zu denen eine Verkürzung der Wurzel, eine Zunahme des Hypokotylumfangs und eine Verkleinerung der Blattspreite gehören. Diese Veränderungen wurden im Wildtyp und in der twisted dwarf-Mutante gleichermaßen beobachtet. Auffällig war, daß die Wurzeln von twisted dwarf-Mutanten, die unter erhöhter Ethylenkonzentration gewachsen waren, alle ein gravitropes Wachstum zeigten, das dem des Wildtyps entsprach. Die erhöhte Ethylenkonzentration konnte jedoch keine weiteren Eigenschaften des twisted dwarf-Phänotyps revertieren. Die Messung der Krümmungswinkel zeigte, daß alle Wurzeln der twisted dwarf-Mutanten, die unter 10 ppm Ethylen angezogen worden waren, gravitrop wuchsen, jedoch nur 27% der unter Luft gewachsen twisted dwarf-Wurzeln einen normalen Gravitropismus zeigten. Die Wurzeln von Wildtyp-Keimlingen wuchsen unter beiden Bedingungen gravitrop.

Um zu überprüfen, ob der Wurzelgravitropismus der twisted dwarf-Mutante durch die Wirkung des Phytohormons Ethylen korrigiert wurde, wurde der Einfluß von Inhibitoren der Ethylenbiosynthese und von Inhibitoren der Ethylenwirkung auf den Wurzelgravitropismus von twisted dwarf- und Wildtyp-Keimlingen untersucht. Es wurde der gleiche Versuch wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings mit dem Zusatz von Silbernitrat im Arabidopsis-Medium, einem Inhibitor der Ethylenwirkung. Eine Konzentration von 1 µM Silbernitrat im Wachstumsmedium und 10 ppm Ethylen in der Wachstumskammer führten bei den Wurzeln der twisted dwarf-Mutante verstärkt zu agravitropem Wachstum. Dieser Effekt wurde für Wildtyp-

Pflanzen nicht festgestellt. Aminoethoxyvinylglycin (AVG), das die endogene Ethylenbiosynthese hemmt, führte in einer Konzentration von 1 μ M dazu, daß nur 12% der Wurzeln von twisted dwarf-Mutanten gravitrop wuchsen. Bei diesem Versuch waren unter Kontrollbedingungen (Luft) 35% der Wurzeln von twisted dwarf-Mutanten gravitrop gewachsen.

- 5 Unter Zusatz von 1 μ M AVG zeigten jedoch auch 41% der Wurzeln von Wildtyp-Pflanzen ein agravitropes Wachstum. Ethylen ist für den Wurzelgravitropismus von Bedeutung, da die Hemmung der endogenen Ethylensynthese auch bei Wildtypwurzeln zum agravitropen Verhalten führt. Mutanten von twisted dwarf in *Arabidopsis thaliana* oder *Lycopersicon esculentum* und anderen Pflanzen können zur Herstellung von Pflanzen und Pflanzenorganen dienen, die eine
- 10 verringerte Menge an Ethylen produzieren oder akkumulieren. Dieser Effekt lässt sich gezielt bei der Beeinflussung der Frucht- und Samenreifung, sowie der Verlängerung und Kontrolle der Blühphase von Zier- und Nutzpflanzen einsetzen, da diese Prozesse durch die Menge an Ethylen in den entsprechenden Organen bzw. Pflanzen kontrolliert werden.

- 15 Da der Gravitropismus der Wurzel in twd-Mutanten unter normalen Wachstumsbedingungen stark reduziert ist und nur bei exogener Zugabe des gasförmigen Phytohormons Ethylen rekonstituiert wird, lässt sich über diese Eigenschaft die Ausprägung des Wurzelgravitropismus einfach regulieren. Hierdurch wird die Verankerung der Wurzel im Erdreich beeinflusst, was Auswirkungen auf die Festigkeit von bodenbedeckenden Pflanzen, sowie generell die
- 20 Verankerung von Nutzpflanzen im Substrat hat. Die Induktion des Wurzelgravitropismus ist durch Ethylen zu beliebigen Zeitpunkten der Entwicklung einleitbar. Diese Tatsache lässt sich auch ausnutzen, andere Entwicklungsprozesse der Pflanze durch Ethylen zu regulieren.

- Da es sich bei *twd* um eine Mutante in einem FK506 bindenden Protein handelt, lassen sich diese
- 25 Pflanzen als nicht-tierische Modelle für Untersuchungen an entsprechenden Immunsuppressiva (besonders FK506 (Tacrolimus), Rapamycin, Cyclosporin A und weiterer Substanzen mit ähnlicher Wirkung) sowie Prozessen der Signalvermittlung der Wirkung von Immunsuppressiva, in der Pharmaforschung einsetzen. Hierbei können neue, pflanzenspezifische zelluläre Interaktionen und Wirkmechanismen studiert werden, die in der Form in tierischen Systemen
- 30 nicht vorhanden sind. Unter anderem lassen sich so an FKBP's verarmte Modelle entwickeln, in denen die Wirkung nicht nur von immunsuppressiven Substanzen sondern auch genetisch modifizierter Liganden für diese Substanzen testen lassen.

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des offenen Leserasters der twisted dwarf cDNA in den aktuellen Sequenzdatenbanken zeigt eine Sequenzidentität von 30-33% und eine Sequenzähnlichkeit von 43-53% zu FKBP's aus Menschen, Tieren und anderen Pflanzen (PILEUP, Genetic Computer Group, Wisconsin Package Version 9.1-Unix, Sept.1997 (Gap creation penalty: 5; gap extension penalty: 1)). Das abgeleitete twisted dwarf Peptid weist bei den für eine FK506 Interaktion 14 identifizierten Aminosäurepositionen in vier Fällen identische und in weiteren vier Fällen konservierte Aminosäureaustausche auf. Im C-terminalen Bereich des Peptids ist eine dreifache Wiederholung eines TPR-Motivs zu finden. Für diese Motive ist in tierischen Systemen eine Interaktion mit Hsp90 mit FKBP's nachgewiesen worden (Callebaut et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6270-6274). Pflanzliche Mutanten dieser Klasse von Proteingenen lassen sich als nicht tierische Modellsysteme für das Studium der Wirkung und Signalweiterleitung von Immunophilinen entwickeln.

Die folgenden Ausführungsbeispiele dienen der Erläuterung der Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen.

I. Allgemeine Methoden

1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung wurden der Phagenvektor Lambda ZipLox und das daraus abgeleitete Plasmid PZL-1 (Newman et al., 1994, Plant Phys. 106: 1241-1255) sowie das Phagemid pBluescript (pBS) (Short et al., 1988, Nucl. Acids Res. 16: 7583-7600) verwendet. Zur Expression in *E.coli* wurde der Expressionsvektor pET3-His (Novagen) verwendet. Für die Transformation von Hefen wurden die Vektoren pAS1 und pACT2 (Clontech, Matchmaker 2-Hybrid System) und pRS314 (Sikorski und Hieter, 1989, Genetics 122: 19-27) verwendet. Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in pRT-W NotI (Überlacker and Werr, 1996, Mol. Breeding 2: 293-295) und in den binären Vektor pGPTV-Bar (Becker et al., 1992, Plant Mol Biol. 20: 1195-1197) kloniert.

2. Bakterien- und Hefestämme

Für den pBluescript KS (pBS) Vektor, das Plasmid pZL-1 sowie für pAS1, pACT2 und pGPTV Konstrukte wurde der *E.coli*-Stamm DH5 α (Hanahan et al., 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) verwendet. Die Expression des twisted dwarf Proteins erfolgte im *E.coli*-Stamm B121 (Studier und Moffat, 1986). Die Transformation der pGPTV-Konstrukte in Arabidopsis-Pflanzen wurde

mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes GV3101:pMP90 (Koncz und Schell, 1990, Mol. Gen. Genet. 204: 383-396) durchgeführt. Die Transformation von 2-Hybridkonstrukten erfolgte in den Hefestamm Y190.

5 3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA in Agrobakterien erfolgte durch direkte Transformation mit nackter DNA nach Höfgen und Willmitzer (1988, Nucl. Acids Res. 16: 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979, Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch
10 auf Korrektheit und Orientierung der inserierten DNA überprüft.

4. Pflanzentransformation

Mit einer positiven Kolonie wurden 150 ml antibiotikahaltiges YEB-Medium angeimpft und 2 Tage bei 28°C geschüttelt. Mit 10-15 ml dieser Vorkultur wurden 500 ml antibiotikahaltiges
15 YEB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert und am nächsten Tag 15 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in Infiltrationsmedium aufgenommen. Die Konzentration der Suspension wurde per Trübungsmessung bestimmt und auf eine OD600 (optische Dichte) zwischen 0,8 und 1,2 eingestellt. In einen Vakuumexikator wurden 400 ml mit Agrobakteriensuspension gefüllte
20 Plastik-Bechergläser gestellt. Töpfe mit Arabidopsis-Pflanzen wurden umgedreht auf die Bechergläser gestellt, so daß die Infloreszenzen der Pflanzen in die Agrobakteriensuspension hineintauchten. Es wurde ein Vakuum von 10-30 mbar für 15 min angelegt und anschließend der Vakuumexikator zügig belüftet. Eine Bakteriensuspension wurde für bis zu vier aufeinanderfolgende Infiltrationen verwendet. Danach wurden die Pflanzen weiter bis zum
25 Abreifen der Schoten unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit) gehalten. Die 10 Pflanzen eines Topfes wurden in zwei Tüten (2 Pools) zu je 5 Pflanzen zum Sammeln der Samen eingetütet, wenn die ältesten Schoten der Pflanzen reif waren. Die gut getrockneten Samen konnten für eine Selektion mit BASTA® (Aventis CropScience, S.A., Lyon Frankreich) direkt auf Erde ausgesät werden.

30

Die Aussaat erfolgte nach Pools getrennt in großen Schalen. Das erste Sprühen der Keimlinge mit BASTA®-Lösung erfolgte, wenn die Keimblätter voll entwickelt waren. Die Keimlinge wurden in den darauffolgenden 6 Tagen noch 1-2 mal mit BASTA® gesprüht. Nicht BASTA®-

resistente Keimlinge blieben noch im Keimblattstadium aus und entwickelten sich nicht weiter. Die resistenten Keimlinge wurden bis zur Samenreife weiter wachsen gelassen und die Samen dieser Pflanzen einzeln abgeerntet.

5 II. Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1: Isolation des FKBP ähnlichen twisted dwarf Gens aus T-DNA getaggtten Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana* mittels Plasmid-Rescue und Isolierung von Vollängen cDNA- und genomischen Klonen aus Genbibliotheken.

10

Aus einer mittels T-DNA transformierten *Arabidopsis thaliana*-Linie (Feldmann, 1991, Plant J. 1:71-82; Forsthoefel et al., 1992, Aust. J. Plant Physiol. 19: 353-366) wurde über Plasmid-Rescue (Schulz et al., 1995, Plant Mol. Biol. Manual, pp 1-17) eine 200 bp lange die T-DNA Insertion flankierende DNA Sequenz des twisted dwarf Gens isoliert. Radioaktiv markierte Proben, die aus den bei der Plasmid-Rescue gewonnenen Plasmiden (Klon pBUB 52) hergestellt wurden, wurden zum Screenen der CD4-7 IPRL-2 cDNA-Bibliothek (Newman et al., 1994, Plant Phys. 106: 1241-1255) und der CD4-11 genomischen Cosmid-Bibliothek (Schulz et al., 1995, Plant Mol. Biol. Manual, pp 1-17) eingesetzt. Ca. 200 000 Klone der cDNA-Bibliothek wurden mit diesen Hybridisierungsproben gescreent. Aus einem positiv reagierenden l-Klon wurde über

15

20

in-vivo-Excision ein Plasmid isoliert und durch Bestimmung der DNA-Sequenz (Dideoxymethode: Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467) analysiert. Aus dieser DNA-Sequenz wurde die Primärstruktur des twisted dwarf Proteins abgeleitet (Klon pBUB 65). Die cDNA wurde anschließend benutzt, um einen genomischen Klon aus der Cosmid-Bibliothek zu isolieren.

25

Ausführungsbeispiel 2: Expression von twisted dwarf Peptiden in *E.coli*, Reinigung der Proteine und Gewinnung von Antiseren gegen das Protein in Kaninchen

30

Partielle cDNA-Sequenzen, die für die Aminosäurepositionen 1-324 und 1-187 kodieren, wurden über PCR amplifiziert und nach Spaltung mit BamHI und XhoII in das Leseraster der His-Tag-Sequenz des mit BamHI linearisierten Vektors pET3 ligiert. Kompetente BI21-Zellen wurden mit den Ligationen transformiert und die Expression der Peptide nach Induktion mit IPTG in Rohextrakten auf Laemmli-Gelen nachgewiesen. Die Fusionspeptide mit dem His-Tag wurden

über Ni-NTA-Agarose (Novagen) gereinigt. Die apparenten Molekulargewichte wurden nach Vergleich mit Größenmarkern als 33 kDa für das Peptid, das den Bereich von Position 1-187 umspannt und als 44kDa für das Peptid des Bereichs von Position 1-324 bestimmt. Zur Immunisierung von Kaninchen wurden das aufgereinigte Peptid (Pos. 1-187) über ein präparatives SDS-PAGE-Gel gereinigt. Die Proteinbande wurde durch Färbung des Gels mit Cu²⁺-Ionen identifiziert, ausgeschnitten und zermörsert. Das zerkleinerte Gel wurde in Puffer aufgenommen und zur Immunisierung von Kaninchen von der Firma BioGenes (Berlin) eingesetzt. Nach der ersten Immunisierung erfolgten zwei weitere Booster-Immunisierungen, bevor Antiseren gegen das twisted dwarf Protein durch Blutungen der Tiere gewonnen wurden. Die Erkennung des twisted dwarf Proteins durch das Antiserum wurde in Immunoblot-Experimenten getestet.

Ausführungsbeispiel 3: Transformation von mutierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit einer Konstruktion zur Überexpression der Kodierregion des twisted dwarf Proteins

15

Zur Komplementation von twisted dwarf-Mutanten (twisted dwarf1-1, twisted dwarf1-3, twisted dwarf1-4) wurde das offene Leseraster des twisted dwarf-Gens anhand von PCR aus dem Plasmid BUB65 amplifiziert und nach BamHI/BglII Spaltung in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pRT- Ω NotI kloniert. Der pRT- Ω NotI besitzt vor der BamHI-Restriktionssequenz einen CaMV 35S Promotor sowie eine Ω -Sequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus, welche die Translation von verschiedenen Reportergenen in Pflanzen 2-10fach erhöhen kann (Gallie et al., 1989, Plant Cell 1: 301-311). Ein Polyadenylierungssignal aus dem Blumenkohlmosaikvirus befand sich hinter der BamHI-Restriktionssequenz. Die Sequenzierung des Inserts zeigte, daß die klonierte twisted dwarf-cDNA-Sequenz keine Sequenzveränderungen aufwies. Die Kassette wurde mit dem Restriktionsenzym AscI aus dem pRT- Ω NotI herausgespalten und nach Auffüllen der überhängenden Enden durch Klenow-Polymerase in die ebenfalls aufgefüllte HindIII-Restriktionsstelle des binären Pflanzenvektors pGPTV-BAR ligiert. Das uidA-Leseraster war zuvor aus dem pGPTV-BAR durch eine SmaI/EcoRI Spaltung deletiert worden.

Die Transformation von twisted dwarf-Mutanten anhand einer Vakuuminfiltration von Blüten erfolgte mit den binären Vektoren unter Verwendung des Agrobakterienstamms GV3101 pMP90. Transgene *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden wie beschrieben auf Herbizidresistenz selektioniert und phänotypisch analysiert. Das Vorhandensein und die Struktur der

transformierten Konstrukte in den transgenen Pflanzen wurde über DNA-Gelblot Analyse festgestellt. Alle mit der Gensequenz des intakten twisted dwarf Gens transformierten Mutantepflanzen zeigten eine Reversion des Phänotyps zum Wildtyp.

5 Ausführungsbeispiel 4: Sequenzanalyse verschiedener mutierter twisted dwarf Allele in *Arabidopsis thaliana*-Mutanten

Weitere *Arabidopsis thaliana*-Mutanten, die den Phänotyp der twisted dwarf-Mutante aufwiesen, wurden aus verschiedenen mutagenisierten Populationen isoliert. Über eine Kreuzungsanalyse
10 mit der durch T-DNA-Insertion generierten Mutante konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen Mutanten Allele des gleichen Gens darstellen. Über ein DNA-Gelblot-Experiment konnte für zwei der Mutanten ein Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) gezeigt werden.

15 Zur genaueren Analyse der twisted dwarf-Mutanten wurden PCR-Produkte der mutierten Allele des Gens sequenziert und mit der Wildtyp-Sequenz verglichen. Die T-DNA Insertion im twisted dwarf-Allel 1-1 liegt im fünften Exon an Position +1484. Eine Deletion von 593 Bp von Position -122 bis +471 führte in der Mutante twisted dwarf1-3 zum Verlust eines Teils des Promotors, des
20 Transkriptionsstarts sowie der ersten 35 Bp des offenen Leserasters. Die Verkürzung eines EcoRI-Fragments von etwa 600 Bp war schon in einem DNA-Gelblot-Experiment beobachtet worden. Eine Nukleotidinsertion im dritten Exon an Position +823 und ein Nukleotidaustausch von Adenin zu Guanin an der Position +829 sind in der Mutante twisted dwarf1-4 identifiziert worden. Der Nukleotideinschub verursacht eine Leserasterverschiebung und führt dadurch zu
25 einem Translationsstop nach 85 Aminosäuren. Bei allen twisted dwarf-Allelen handelt es sich um sogenannte Nullallele, die kein funktionelles Genprodukt mehr hervorbringen können. Alle untersuchten twisted dwarf-Mutanten zeigen die gleiche Ausprägung des oben beschriebenen twisted dwarf-Phänotyps.

Ausführungsbeispiel 5: Identifizierung von Homologen des *twd*-Gens aus anderen Pflanzenarten.

30

1. Identifizierung des *twd*-Homologen aus *Lycopersicon esculentum*

Zur Amplifikation und nachfolgenden Identifikation von Homologen des *twd*-Gens aus anderen Pflanzen wurden die Oligonukleotide *twd*-S und *twd*-A als PCR-Primer aus der Gensequenz des

twd-Gens abgeleitet. Mittels dieser Oligonukleotide wurde in einer PCR unter folgenden Bedingungen auf DNA einer cDNA-Bank von Tomate (*Lycopersicon esculentum*) Sequenzen des *twd*-Homologs aus Tomate isoliert:

- 5 1 x 94°C 2 min
dann 35 Zyklen:
94°C 1 min
58°C 1 min
72°C 2 min
10 dann 4°C bis zur Entnahme aus der PCR-Maschine.

Sequenz des Primers twd-S:

5' -CT(C/T) (G/T)TG C(A/T)T GT(G/T) (G/T)GC TGG GAA TTA G-3'

Sequenz des Primers twd-A:

- 15 5' -CCA TCC ATT TT(C/T) CTT CT(A/G) T(G/C)T GCT GC-3'

- Das erhaltene PCR-Produkt (SEQ ID NO:4) wurde in den Vektor pGEM-T easy® (Promega) kloniert und durch Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Mit Hilfe der Sequenzen der EST-Klone AW038756, AI895686, AW441601, AW222544 aus Tomate (*Lycopersicon*
20 *esculentum*) (GenBank online, Release <115), die unter Zuhilfenahme des Similaritätsalgorithmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al., Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990) (tblastn, cutoff für P value: $6e^{-26}$, Matrix: Blosom 62, Gap existence cost: 11, Per residue gap cost:1) mit der Aminosäuresequenz des Arabidopsis
25 TWD-Proteins gefunden wurde, konnte ein cDNA Contig über insgesamt 1142 Basenpaare zusammengestellt werden (TomTWDContig; SEQ ID NO:5). Der Bereich der Sequenzüberlappungen der EST-Klone mit dem Klon TomTWD umspannt die Nukleotid-Positionen 1 bis 95 von TomTWD mit AW441601 und 121 bis 140 von TomTWD mit AW222544. Die Translation des längsten offenen Leserasters der Nukleotidsequenz von
30 TomTWDContig in Aminosäuren ergibt ein durchlaufendes Peptid (TTP) mit einer Länge von 320 Aminosäuren (SEQ ID NO:6). Die Identität zum TWD Protein aus Arabidopsis beträgt 74,1%, die Ähnlichkeit 85,3% zu den Aminosäurepositionen 1 bis 316 des TWD Proteins aus Arabidopsis.

2. Identifizierung des twd-Homologen aus *Zea mays*

Mit Hilfe der Sequenzen der EST-Klone AW216068 und AW171820 aus *Zea mays* (GenBank online, Release <115), die unter Zuhilfenahme des Similaritätsalgorithmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al., Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990),
5 tblastn, cutoff für P value < $1e^{-31}$, Matrix: Blosom 62, Gap existence cost: 11, Per residue gap cost:1) mit der Aminosäuresequenz des Arabidopsis TWD-Proteins in der Non-redundant Database of GenBank EST Division/Subdivision *Zea mays* gefunden wurde, konnte ein cDNA Contig über insgesamt 776 Basenpaare zusammengestellt werden (ZmTWDContig, SEQ ID NO:7). Die Translation des längsten offenen Leserasters der Nukleotidsequenz von
10 ZmTWDContig in Aminosäuren ergibt ein durchlaufendes Peptid (ZmTWD, SEQ ID NO:8) mit einer Länge von 168 Aminosäuren. Die Identität zum TWD Protein aus Arabidopsis beträgt 68,5%, die Ähnlichkeit 79,8% zu den Aminosäurepositionen 196 bis 365 des TWD Proteins aus Arabidopsis.

24
Patentansprüche

1. Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 oder deren Fragment oder Derivat oder eine Nukleinsäuresequenz, die mit der
5 Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 hybridisiert und die biologische Aktivität der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 besitzt.
2. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, wobei die hybridisierende Nukleinsäuresequenz
10 unter stringenten Bedingungen mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 hybridisiert.
3. Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:6 oder SEQ ID NO:8.
15
4. Vektor, umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2.
5. Vektor gemäß Anspruch 4, ferner umfassend ein oder mehrere Steuerelemente, die die
20 Transkription und/oder Translation der Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 gewährleisten.
6. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen, umfassend das stabile Integrieren mindestens einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzengeweben und Regeneration der erhaltenen Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu
25 Pflanzen.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die integrierte Nukleinsäuresequenz ferner ein oder mehrere Steuerelemente umfasst, die die Transkription und/oder Translation der Nukleinsäuresequenz gewährleisten.
30
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei die integrierte Nukleinsäuresequenz in Antisense-Orientierung exprimiert wird.

9. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei die integrierte Nukleinsäuresequenz die Aktivität eines Ribozyms besitzt, das die biologische Aktivität der endogenen Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 unterdrückt.
- 5 10. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Nukleinsäuresequenz in den genomischen Bereich des homologen endogenen Gens durch homologe Rekombination integriert wird.
11. Transformierte Pflanzenzelle oder transformiertes Pflanzengewebe, umfassend eine stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder des Pflanzengewebes integrierte Nukleinsäuresequenz
10 gemäß Anspruch 1 oder 2.
12. Pflanzenzelle oder Pflanzengewebe nach Anspruch 11, regenerierbar zu einer Samenproduzierenden Pflanze.
- 15 13. Transgene Pflanze und deren Samen umfassend eine rekombinante Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2.



Figur 1A

1 GTCTAAGAACCTTAAGGAGAAAGAGATTAAGAGGCAGACATTGCTTGAGCTTGTTGATTA
61 TGTTCATCAGTTGGTTTTAAGTTTAACGATGTTTCGATGCAAGAGTTAACGAAGATGGT
121 AGCGGTTAATCTGTTTAGAACTTTTCCTTCTGCGAATCACGAGAGTAAAAATTCCTTGAAAT
181 ACATGATATGGATGATGAAGAACCTTCTTTGGAGCCAGCTTGGCCTCATGTTCAAGTTGT
241 GTATGAGATTCTTCTCAGATTCTGTGGCTTCTCCCATGACTGATGCAAAGCTTGCCAAGAG
301 ATATATTGACCATTCTTTTGTCTTGAAGCTCTTAGACTTGTTTGATTCTGAAGATCAAAG
361 AGAGAGGGAATATCTAAAACTATTCTGCATCGGGTGACGGGAAGTTCATGGTGCATCG
421 ACCTTACATCAGAAAGGCGATAAACAATATCTTCTACAGATTCATATCCGAGACTGAAAA
481 GCATAATGGCATTGCGGAGTTGCTAGAGATTCTTGAAGTATAATTAATGGTTTTGCTTT
541 GCCTTTTAAAGAAGAGCACAAAGCTCTTCCTTTTGGCGAGCCTTGATTCTCTCCACAAGCC
601 TAAATGTTTCATCAGTCTATCACCAACAGCTTTCGTATTGCATTGTTTCAGTTTGTAGAAAA
661 GGACTTCAAGCTCGCTGATACCGTTATTAGAGGTCTTTTAAATATTGGCCTGTGACTAA
721 CAGCTCAAAGGAAGTTATGTTTCTTGAGAGTTAGAAGAAGTCTTGAAGCAACTCAAGC
781 CGCTGAGTTTCAACGTTGTATGGTTCCATTATCCCGACAAATTGCTCGATGCCTCAACAG
841 TTCACATTTCCAGGTTGAGTCTTTGACTATCATCACAACCTTCATATCTATCTCTCTTGA
901 TAAAGTCTTGACCTATATATGAAGTTGTACTTTTTGTTTGTACAGTTGCTGAAAGAGCA
961 TTGTTTCTATGGAACAACGATCACATAAGAAACCTGATCACTCAGAACCATAAAGTGATA
1021 ATGCCTATAGTCTTCCCAGCTCTTGAGAGAAACACGCGTGGACATTGGAACCAAGCAGTT
1081 CAAAGTCTGACTATAAACGTGAGGAAAGTATTATGCGAGATTGACCAAGTTCTTTTCGAC
1141 GAGTGTTTAGCCAAATTCCAAGTAGAAGAAGTGAATAAAACAGAGGTTAAAGCGAAACGG
1201 GAAAGGACATGGCAACGGTTAGAAGATTTAGCTACTTCAAAGACCGTTGTAACCAACGAG
1261 GCAGTACTGGTTCCAAGATTTGTGTCCTCAGTCAATCTTACTACAAGCAGCTCTGAGTCC
1321 ACAGGGTCGTAGTAGGCTCTCGTAGGTTACTATGTACTTGTAACAAATATTTGTGGTCAC
1381 TATAGAAATGGTTCTTGAGAGACGACTGTATAATTATTTTTTTAAATTATAATCTTTTGG
1441 GTCAAATTGAGAATATTTGATATTATTTTACTGAATTATAATAAACGCCGTTAAACTCT
1501 CGTTAGTTAACGGCTGACTCTGAAGTGAAAAGTCAAAGGGTCTCTTTATATTT
1561 TCAGAATCAAAATCTGAAATTTATCTCTCGGTCGATCCAGTCTTCGTGAGTGACTTCGAC
1621 GACGACGACGAGTCACACTACTCTTGAGCTTCTCATACTTCGTAAGTTCACTCTCCTCTT
1681 CTCTAAATTGACAACTTTTTCTTCGTTTTCTGCTATTATTGACGACGAGACTTGATTTT



Figur 1B

1741 GTTTTGAAATGAAATGGTTCAAGTAGCTGACTTCGACTATGTTCTTTTGGGTTTTTGTCA
1801 TTGAATCTTACTTGTCTGATTTGGTCGATGTTTAATCAATTCAACACTTAAAGATTCAAT
1861 TTTTGGATTGACACTTGCACATTTTTATTTCAGACCCAGGTTGATTGGGAAATAATGGAT
M D 2
1921 GAATCTCTGGAGCATCAAACCTCAAACACATGGTAAGTAAATTTTCATAGATTTAATCTCT
E S L E H Q T Q T H D 13
1981 CTGAATACATATATATGACTTCAATATGTTTGATTGGAGTTTTTTTTGTTGTCCCATATTC
2041 AATTGGATGCTTTGTAAAGGATAAATGTCTATCAAATTATGTTGACTGCGTTATTCTTT
2101 CTAAATCATATTGTGAATCTTGAACAAAGCATGTATAACAACAAATTGTTAGACTTAAT
2161 AACTCCTTTTCTGTTTGTTAAGAATTGAGAATGACTATTGGGGTTGACTAATGCATCTTT
2221 TGTGGCTCCAGACCAAGAGAGCGAAATAGTTACTGAAGGAAGTGCCGTTGTGCATAGTGA
Q E S E I V T E G S A V V H S E 29
2281 GCCATCTCAAGAGGGTAATGTTCTCTCTAAAGTTGATAGTGAAGCTGAGGTCTTGGATGA
P S Q E G N V P P K V D S E A E V L D E 49
2341 GAAAGTCAGTAAGCAGATTATAAAGGAAGGTCACGGTTCCAAACCATCCAAGTACTCTAC
K V S K Q I I K E G H G S K P S K Y S T 69
2401 ATGCTTTTGTAAGTACCCTTTAGCTTTCTGTTGATTGGATGTTGATTTTTTCGATTGCACT
C F L 72
2461 TGTTGGCCTATTGCTACTGTTTATTTGAATCTTTCTATCTGACCAATTTTCATATTGGCCA
2521 TAGTGCCTACAGGGCATGGACCAAAAACCTCGCAGCACAAATTTGAGGATACATGGCATG
H Y R A W T K N S Q H K F E D T W H E 91
2581 AGCAGCAACCTATTGAATTGGTTCTTGGAAAAGGTATGTGGCTGTGCAATATGTACTCTA
Q Q P I E L V L G K E 102
2641 CACCTCCATTTGTTAGATGAATCGTCATTGGTAAATTTGATGAGTTAGCTTGTGTATTA
2701 TATGAACCCAATGAGATGGATATTTGGGAGGAAAAAAGATTGAGTTTTGTATTTTTTTTTG
2761 CTTCAATGCTGATTAGCCCATTTTAACGTCACTATACAATTTTTTTTATAAAAAAGATTG
2821 TGCACTAAGAGTGAAATGTTGTCTGTGAGACAGAGAAAAAAGAACTAGCCGTTTTAGCCA
K K E L A G L A I 111
2881 TCGGTGTTGCTAGCATGAAGTCTGGTGAACGTGCGCTTGTGCATGTTGGCTGGGAATTAG
G V A S M K S G E R A L V H V G W E L A 131
2941 CTTATGGGAAAGAAGGAAACTTTTTCTTTTCCCAATGTTCCACCTATGGCAGACTTGTTAT
Y G K E G N F S F P N V P P M A D L L Y 151
3001 ATGAGGTGGAAGTTATTGGGTTTGATGAAACAAAGGAGGTAAGTTATTTCTATACCATC
E V E V I G F D E T K E 163



Figur 1C

3061 ATCTTGTTTCCTTACCAAGACGACTCCACATCCAAGCTTTATCCCAACCTCCTTGCTTAC
3121 CTCTCTGACTTAGATGATGTATTGAACAGGGAAAAGCTCGCAGTGATATGACTGTAGAGG
G K A R S D M T V E 174
3181 AAAGGATTGGTGCAGCAGACAGAAGAAAAATGGATGGGAATTCTCTTTTAAAGGAGGAGA
R I G A A D R R K M D G N S L F K E E K 194
3241 AACTGGAGGAAGCCATGCAACAGTATGAAATGGTTATGCATCTCTCTATCTCTATCTC
L E E A M Q Q Y E M 204
3301 TCTTTCCAACAATTACGGTCAAAGTTTAGGTTTTCAGGCATACTTAGTGAGTCTGCTCGA
3361 GGCTCTTGTTCTTCTTTTCGGCTTTTGATTAGTCATGGTTTGTCTGTTTCAGGCCATAGC
A I Y 207
3421 ATACATGGGGGACGATTTTATGTTTCAGCTGTATGGGAAGTACCAGGATATGGCTTTAGC
Y M G D D F M F Q L Y G K Y Q D M A L A 227
3481 AGTTAAAAACCCATGCCATCTTAACATAGCAGCTTGCCTCATCAAACATAAAGGATACGA
V K N P C H L N I A A C L I K L K R Y D 247
3541 TGAAGCAATTGGTCACTGCAACATTGTAAGACTCATCAAACCATTATTGAAGAAAATC
E A I G H C N I 255
3601 ATTAAAGTTCATACTCGGTTTCTCGAAATCTAATCAAACCTCAAACCTTATCAGGTGTTG
V L 257
3661 ACAGAAGAAGAGAAAAACCCAAAAGCACTGTTTCAGAAGAGGGAAAAGCAAAGGCAGAGCTA
T E E E K N P K A L F R R G K A K A E L 277
3721 GGACAGATGGACTCAGCACGTGATGATTTCCGAAAGGCACAAAAGTATGCTCCTGACGAC
G Q M D S A R D D F R K A Q K Y A P D D 297
3781 AAGGCGATTAGAAGAGAGCTACGAGCACTTGCAGAGCAAGAGAAAGCCTTGTACCAAAAG
K A I R R E L R A L A E Q E K A L Y Q K 317
3841 CAGAAAGAAATGTACAAAGGAATATTCAAAGGGAAAGATGAAGGTGGTGCTAAGTCAAAG
Q K E M Y K G I F K G K D E G G A K S K 337
3901 AGCCTTTTTTGGTTGATAGTGTATGGCAATGGTTTGTTCCTTTTCTCCCGTATCTTT
S L F W L I V L W Q W F V S L F S R I F 357
3961 CGACGCCACAGAGTTAAAGCAGATTAATGTATGAAGAAGGGTTACAATTA
R R H R V K A D * 365
351 SLFSRIFRRH RVKAD



FIGUR 2

TTP 1 MAEVEEEQQLQNSSVDQGSTDEIIAEGASVVRGELPQDDAGPPKVDSEVE 50
 TWD 1 ...MDESLEHOTQTHDQES..EIVTEGSAVVHSEPSQEGNVPPKVDSEAE 45
 TTP 51 VLHEKVTQKQIVKEGHGQKPSKYATCFVHYRAWAESTQHKFEDTWREQQPL 100
 TWD 46 VLDEKVSQKQIIEKGHGSKPSKYSTCFLHYRAWTKNSQHKFEDTWREQQPI 95
 TTP 101 ELVIGKERKEMTGLAIGVNSMKSGERALFHVWGWEAYGKEGNFSFPNVPP 150
 TWD 96 ELVLGKEKKELAGLAIGVASMKSGERALVHVWGWEAYGKEGNFSFPNVPP 145
 TTP 151 TADVLYEVELIGFDETGEKGARGDMTVEERIGTADRRKMDGNALFKEEKL 200
 TWD 146 MADLLYEVEVIGFDETKEGKARSDMTVEERIGAADRRKMDGNSLFKEEKL 195
 TTP 201 EEAMQOQYEMAIAYMGDDFMFQYFGKFRDMALAVKNPCHLNMAACLLKLQR 250
 TWD 196 EEAMQOQYEMAIAYMGDDFMFQYLYGKYQDMALRVKNPCHLNIAACLIKLKR 245
 TTP 251 YDEAIAQCSIVLAEENNVKALFRRGKARSILGOTDAAREDFLKARKLAP 300
 TWD 246 YDEAIGHCNIVLTEEEKNPALFRRGKAKAELGQMDSARDDFRKAQKYAP 295
 TTP 301 QDKAITRELNLIAEHKAVY..... 320
 TWD 296 DDKAIRRELRLALAEQEKALYQKQKEMYKGIFKGKDEGGAKSKSLFWLIVL 345

FIGUR 3

ZmTWD 1 EEAMQOQYEMAIAYMGDDFMFQYFGKYRDMALAVKNPCHLNMAACLIKLKR 50
 TWD 196 EEAMQOQYEMAIAYMGDDFMFQYLYGKYQDMALRVKNPCHLNIAACLIKLKR 245
 ZmTWD 51 FDEAIAQCSIVLTEDESNVKALFRRGKAKSELGOTESAREDFLKAKKYS 100
 TWD 246 YDEAIGHCNIVLTEEEKNPALFRRGKAKAELGQMDSARDDFRKAQKYAP 295
 ZmTWD 101 EXKEIIRELRLALAEQXKALYQKQKELYKGLFGPSPE...AKPKAKYLVVF 148
 TWD 296 DDKAIRRELRLALAEQEKALYQKQKEMYKGIFKGKDEGGAKSKSLFWLIVL 345
 ZmTWD 149 WQWLVSFILYLAGMFKRKNE 168
 TWD 346 WQWFVSLFSRIFRRHRVKAD 365



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Schulz Dr., Burkhard

5 <120> DNA-Sequenz eines FKBP ähnlichen Proteins

<130> SCU-001PCT

<140> xx

10 <141> 2000-02-18

<150> DE 199 07 598.0

<151> 1999-02-22

15 <160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 4010

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

25 gtctaagaac cttaaggaga aagagattaa gaggcagaca ttgcttgagc ttgttgatta 60
tggtgcatca gttggtttta agtttaacga tgtttcgatg caagagttaa cgaagatggg 120
agcggttaat ctgttttagaa cttttccttc tgcgaaatcac gagagtaaaa ttcttgaaat 180
acatgatatg gatgatgaag aaccttcttt ggagccagct tggcctcatg ttcaagttgt 240
gtatgagatt cttctcagat tcgtggcttc tcccatgact gatgcaaagc ttgccaagag 300
30 atatattgac cattcttttg tcttgaagct cttagacttg ttgattctg aagatcaaaag 360
agagagggaa tatctaaaaa ctattctgca tcgggtgtac ggggaagttca tgggtgcatcg 420
accttacatc agaaaggcga taaacaatat cttctacaga ttcatatccg agactgaaaa 480
gcataatggc attgcgaggt tgctagagat tcttggaagt ataattaatg gttttgcttt 540
gcctttaaaa gaagagcaca agctcttctt tttgcgagcc ttgattcttc tccacaagcc 600
35 taaatgttca tcagtctatc accaacagct ttcgatttgc attgttcagt ttgtagaaaa 660
ggacttcaag ctgctgata ccgttattag aggtctttta aaatattggc ctgtgactaa 720
cagctcaaag gaagttatgt ttcttgaga gttagaagaa gtcttggaag caactcaagc 780
cgctgagttt caacgttgta tggttccatt atcccgacaa attgctcgat gcctcaacag 840
ttcacatttc caggttcgag tctttgacta tcatcacaac ttcatatcta tctctcttga 900
40 taaagtcttg tacctatata tgaagttgta ctttttgttt gtcaggttgc tgaaagagca 960
ttgtttctat ggaacaacga tcacataaga aacctgatca ctcagaacca taaagtgata 1020
atgcctatag tcttcccagc tcttgagaga aacacgcgtg gacattggaa ccaagcagtt 1080
caaagtctga ctataaacgt gaggaaagta ttatgcgaga ttgaccaagt tcttttcgac 1140
gagtgtttag ccaaattcca agtagaagaa gtgaataaaa cagagggttaa agcgaaacgg 1200
45 gaaaggacat ggcaacgggt agaagattta gctacttcaa agaccgttgt aaccaacgag 1260



gcagtactgg ttccaagatt tgtgtcctca gtcaatctta ctacaagcag ctctgagtc 1320
acagggtcgt agtaggctct cgtaggttac tatgtacttg taacaaatat ttgtggtcac 1380
tatagaaatg gttcttgaga gacgactgta taattatttt tttaaattat aatcttttgg 1440
gtcaaattga gaatatgtga tattatttta ctgaattata ataaacgccg ttaaaactct 1500
5 cgttagttaa cggctgactc tgaagtgaag actgaaaagt cgaagggctc ctttatattt 1560
tcagaatcaa aatctgaaat ttatctctcg gtcgatccag tcttcgtgag tgacttcgac 1620
gacgacgacg agtcacacta ctcttgagct tctcatactt cgtaagttca ctctcctctt 1680
ctctaaattg acaaactttt tcttcgtttt ctgctattat tgacgacgag acttgatttt 1740
gttttgaaat gaaatggttc aagtagctga cttcgactat gttcttttgg gtttttgtca 1800
10 ttgaatctta cttgtctgat ttggctgatg tttaatcaat tcaacactta aagattcaat 1860
ttttggattg acacttgacac atttttatct agaccagggt tgatttggga aataatggat 1920
gaatctctgg agcatcaaac tcaaacacat ggtaagtaaa ttttcataga tttaatctct 1980
ctgaatacat atatatgact tcaatatgtt tgattggagt ttttttgttg tcccatattc 2040
aattggatgc tttgttaaag gataaatgtc tatcaaatta tgttgactgc gttattcttt 2100
15 ctaaatacata ttgtgaatct tggaacaaag catgtataca acaaatttgt tagacttaat 2160
aactcctttt ctgtttgtta agaattgaga atgactattg gggttgacta atgcatcttt 2220
tgtggctcca gaccaagaga gcgaaatagt tactgaagga agtgccgttg tgcatagtga 2280
gccatctcaa gagggtaatg ttctctctaa agttgatagt gaagctgagg tcttggatga 2340
gaaagtcatg aagcagatta taaaggaagg tcacgggttcc aaaccatcca agtactctac 2400
20 atgcttttgt aagtaccctt tagctttctg ttgattggat gttgattttt cgattgcact 2460
tgttggccta ttgctactgt ttatttgaat ctttctatct gaccaatttc atattggcca 2520
tagtgcacta cagggcatgg accaaaaact cgcagcacia atttgaggat acatggcatg 2580
agcagcaacc tattgaattg gttcttgga aaggtatgtg gctgtcgaat atgtactcta 2640
cacctccatt tcgttagatg aatcgctcatt ggtaaatttg atgagttagc ttgtgtatta 2700
25 tatgaacca atgagatgga tatttgggag gaaaaaagat tgagttttgt attttttttg 2760
cttcaatgct gattagccca ttttaacgtc actatacaat tttttttata aaaaagattg 2820
tgcactaaga gtgaaatgtt gtctgtgaga cagagaaaaa agaactagcc ggttttagcca 2880
tcgggtgttg tagcatgaag tctgggtgaac gtgcgcttgt gcatgttggc tgggaattag 2940
cttatgggaa agaaggaaac ttttcttttc ccaatgttcc acctatggca gacttggtat 3000
30 atgaggtgga agttattggg tttgatgaaa caaaggagggt aagttatttc ctataccatc 3060
atcttgtttc cttaccaaga cgactccaca tccaagcttt atcccaacct ccttgcttac 3120
ctctctgact tagatgatgt attgaacagg gaaaagctcg cagtgatatg actgtagagg 3180
aaaggattgg tgcagcagac agaagaaaaa tggatgggaa ttctcttttt aaggaggaga 3240
aactggagga agccatgcaa cagtatgaaa tggttatgca tctctctcta tctctatctc 3300
35 tctttccaac aattacgggc aaagtttagg ttttcaggca tacttagtga gtctgctcga 3360
ggctcttggt tcttctttcg gcttttgatt agtcatgggt ttgctgtttc aggccatagc 3420
atacatgggg gacgatttta tgtttcagct gtatgggaag taccaggata tggcttttagc 3480
agttaaaaaac ccatgccatc ttaacatagc agcttgctc atcaaactaa aacgatacga 3540
tgaagcaatt ggtcactgca acattgtaag actcatcaaa ccattcattt gaagaaaatc 3600
40 attaaagttc atactcggtt tctcgaaatc taatcaaact caaaacctta tcagggtgttg 3660
acagaagaag agaaaaaccc aaaagcactg ttcagaagag ggaaagcaaa ggcagagcta 3720
ggacagatgg actcagcagc tgatgatttc cgaaaggcac aaaagtatgc tctgacgac 3780
aaggcgatta gaagagagct acgagcactt gcagagcaag agaaagcctt gtacaaaaag 3840
cagaaagaaa tgtacaaaag aatattcaaa gggaaagatg aaggtgggtg taagtcaaaag 3900
45 agcctttttt gggtgatagt gttatggcaa tgggttgttt cccttttctc ccgtatcttt 3960



cgacgccaca gagttaaagc agattaatgt atgaagaagg gttacaatta

4010

<210> 2

5 <211> 1270

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

10 gaaaagtcga aggggtctctt tatattttca gaatcaaaat ctgaaattta tctctcggtc 60
 gatccagtct tcgtgagtga cttcgacgac gacgacgagt cactactctc ttgagcttct 120
 catacttcac ccagggtgat ttgggaaata atggatgaat ctctggagca tcaaactcaa 180
 acacatgacc aagagagcga aatagttact gaaggaagtg ccgttggtgca tagtggccat 240
 ctcaagaggg taatgttcct cctaaagttg atagtgaagc tgaggtcttg gatgagaaag 300
 15 tcagtaagca gattataaag gaaggtcacg gttccaaacc atccaagtac tctacatgct 360
 tttgtcacta cagggcatgg accaaaaact cgcagcacia atttgaggat acatggcatg 420
 agcagcaacc tattgaattg gttcttgga aagagaaaaa agaactagcc ggtttagcca 480
 tcggtgttg tagcatgaag tctggtgaac gtgcgcttgt gcatgttggc tgggaattag 540
 cttatgggaa agaaggaaac ttttcttttc ccaatgttcc acctatggca gacttggtat 600
 20 atgaggtgga agttattggg ttgatgaaa caaaggaggg aaaagctcgc agtgatatga 660
 ctgtagagga aaggattggt gcagcagaca gaagaaaaat ggatgggaat tctcttttta 720
 aggaggagaa actggaggaa gccatgcaac agtatgaaat ggccatagca tacatggggg 780
 acgattttat gtttcagctg tatgggaagt accaggatat ggcttttagca gttaaaaacc 840
 catgccatct taacatagca gcttgccctca tcaaactaaa acgatacgat gaagcaattg 900
 25 gtcactgcaa cattgtgttg acagaagaag agaaaaacc aaaagcactg ttcagaagag 960
 ggaaagcaaa ggcagagcta ggacagatgg actcagcacg tgatgatttc cgaaaggcac 1020
 aaaagtatgc tctgacgac aaggcgatta gaagagagct acgagcactt gcagagcaag 1080
 agaaagcctt gtacaaaaag cagaaagaaa tgtacaaagg aatattcaaa gggaaagatg 1140
 aaggtggtgc taagtcaaag agcctttttt gggtgatagt gttatggcaa tgggttgttt 1200
 30 cccttttctc ccgtatcttt cgacgccaca gagttaaagc agattaatgt atgaagaagg 1260
 gttacaatta 1270

<210> 3

35 <211> 365

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

40 Met Asp Glu Ser Leu Glu His Gln Thr Gln Thr His Asp Gln Glu Ser
 1 5 10 15

Glu Ile Val Thr Glu Gly Ser Ala Val Val His Ser Glu Pro Ser Gln
 20 25 30

45



Glu Gly Asn Val Pro Pro Lys Val Asp Ser Glu Ala Glu Val Leu Asp
 35 40 45
 Glu Lys Val Ser Lys Gln Ile Ile Lys Glu Gly His Gly Ser Lys Pro
 5 50 55 60
 Ser Lys Tyr Ser Thr Cys Phe Leu His Tyr Arg Ala Trp Thr Lys Asn
 65 70 75 80
 10 Ser Gln His Lys Phe Glu Asp Thr Trp His Glu Gln Gln Pro Ile Glu
 85 90 95
 Leu Val Leu Gly Lys Glu Lys Lys Glu Leu Ala Gly Leu Ala Ile Gly
 100 105 110
 15 Val Ala Ser Met Lys Ser Gly Glu Arg Ala Leu Val His Val Gly Trp
 115 120 125
 Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Glu Gly Asn Phe Ser Phe Pro Asn Val Pro
 20 130 135 140
 Pro Met Ala Asp Leu Leu Tyr Glu Val Glu Val Ile Gly Phe Asp Glu
 145 150 155 160
 25 Thr Lys Glu Gly Lys Ala Arg Ser Asp Met Thr Val Glu Glu Arg Ile
 165 170 175
 Gly Ala Ala Asp Arg Arg Lys Met Asp Gly Asn Ser Leu Phe Lys Glu
 180 185 190
 30 Glu Lys Leu Glu Glu Ala Met Gln Gln Tyr Glu Met Ala Ile Ala Tyr
 195 200 205
 Met Gly Asp Asp Phe Met Phe Gln Leu Tyr Gly Lys Tyr Gln Asp Met
 35 210 215 220
 Ala Leu Arg Val Lys Asn Pro Cys His Leu Asn Ile Ala Ala Cys Leu
 225 230 235 240
 40 Ile Lys Leu Lys Arg Tyr Asp Glu Ala Ile Gly His Cys Asn Ile Val
 245 250 255
 Leu Thr Glu Glu Glu Lys Asn Pro Lys Ala Leu Phe Arg Arg Gly Lys
 260 265 270
 45



Ala Lys Ala Glu Leu Gly Gln Met Asp Ser Ala Arg Asp Asp Phe Arg
 275 280 285

5 Lys Ala Gln Lys Tyr Ala Pro Asp Asp Lys Ala Ile Arg Arg Glu Leu
 290 295 300

Arg Ala Leu Ala Glu Gln Glu Lys Ala Leu Tyr Gln Lys Gln Lys Glu
 305 310 315 320

10 Met Tyr Lys Gly Ile Phe Lys Gly Lys Asp Glu Gly Gly Ala Lys Ser
 325 330 335

Lys Ser Leu Phe Trp Leu Ile Val Leu Trp Gln Trp Phe Val Ser Leu
 340 345 350

15 Phe Ser Arg Ile Phe Arg Arg His Arg Val Lys Ala Asp
 355 360 365

20 <210> 4
 <211> 140
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

25 <400> 4
 cttatggaaa agaaggaaac ttctctttcc ctaatgtccc acctacagct gatgtattgt 60
 atgaggttga gttgattggc ttcgatgaga caggagaagg aaaagcacga ggtgacatga 120
 cagtagagga gagaattggg 140

30 <210> 5
 <211> 1142
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

35 <400> 5
 tttcagataa acccaactca attttcttgg gattttgaca ctacatgcgg tgagaattac 60
 ttccaattgt cgagaagatt agtacgtggg tacttgggct gctggtgcta ttctgggggtt 120
 taagaaaatt gagcaagatt tcgaataatg gctgaagtag aagaggagca gcagctgcag 180
 40 aattcatcag ttgaccaggg tagtactgat gaaatcatcg ctgaaggcgc ttcagttggtt 240
 cgtggagaac ttccacagga tgatgctggg ccgccaaaag ttgattcaga agtgggaagtc 300
 ctccatgaaa aagtaaccaa gcaaattggt aaagaaggcc atggtcagaa gccatcaaaa 360
 tacgcaacat gcttcgtgca ttacagggca tgggctgaaa gcacgcagca caagtttgaa 420
 gatacatggc gtgagcaaca acctcttgag ctggttatag gaaaagagag aaaggaaatg 480
 45 actggcctag ctattggcgt taacagcatg aaatccggtg agcgtgcttt atttcatggt 540



ggctgggaac tagcttatgg aaaagaagga aacttctctt tccctaattgt cccacctaca 600
 gctgatgtat tgtatgaggt tgagttgatt ggcttcgatg agacaggaga aggaaaagca 660
 cgaggtgaca tgacagtaga ggagagaatt gggacagcag atagaagaaa gatggatgga 720
 5 aatgctttat ttaaggaaga gaaactggag gaagctatgc aacagtatga aatggccatt 780
 gcatatatgg gagatgactt catgtttcag ctgttcggta agttccggga catggcttta 840
 gctgtaaaga atccctgccca tctgaacatg gcagcctgcc tgctgaagct ccagcgatat 900
 gatgaagcca ttgcacaatg tagcattgtc ctagcagaag aagaaaacaa tgtaaaagcg 960
 ttgttttaggc gtggaaaggc taggtctata cttggtcaga ctgatgcagc tctgtaggac 1020
 ttccttaaag cacgtaagct tgctccacaa gataaagcca ttacaaggga attgaatttg 1080
 10 attgcagaac acgagaaggc tgtctattag aaacaaaagg aactttacaa aggactattt 1140
 gg 1142

<210> 6

15 <211> 320

<212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 6

20 Met Ala Glu Val Glu Glu Glu Gln Gln Leu Gln Asn Ser Ser Val Asp
 1 5 10 15

Gln Gly Ser Thr Asp Glu Ile Ile Ala Glu Gly Ala Ser Val Val Arg
 20 25 30

25

Gly Glu Leu Pro Gln Asp Asp Ala Gly Pro Pro Lys Val Asp Ser Glu
 35 40 45

Val Glu Val Leu His Glu Lys Val Thr Lys Gln Ile Val Lys Glu Gly
 30 50 55 60

His Gly Gln Lys Pro Ser Lys Tyr Ala Thr Cys Phe Val His Tyr Arg
 65 70 75 80

35 Ala Trp Ala Glu Ser Thr Gln His Lys Phe Glu Asp Thr Trp Arg Glu
 85 90 95

Gln Gln Pro Leu Glu Leu Val Ile Gly Lys Glu Arg Lys Glu Met Thr
 100 105 110

40

Gly Leu Ala Ile Gly Val Asn Ser Met Lys Ser Gly Glu Arg Ala Leu
 115 120 125

Phe His Val Gly Trp Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Glu Gly Asn Phe Ser
 45 130 135 140



Phe Pro Asn Val Pro Pro Thr Ala Asp Val Leu Tyr Glu Val Glu Leu
 145 150 155 160

5 Ile Gly Phe Asp Glu Thr Gly Glu Gly Lys Ala Arg Gly Asp Met Thr
 165 170 175

Val Glu Glu Arg Ile Gly Thr Ala Asp Arg Arg Lys Met Asp Gly Asn
 180 185 190

10 Ala Leu Phe Lys Glu Glu Lys Leu Glu Glu Ala Met Gln Gln Tyr Glu
 195 200 205

15 Met Ala Ile Ala Tyr Met Gly Asp Asp Phe Met Phe Gln Leu Phe Gly
 210 215 220

Lys Phe Arg Asp Met Ala Leu Ala Val Lys Asn Pro Cys His Leu Asn
 225 230 235 240

20 Met Ala Ala Cys Leu Leu Lys Leu Gln Arg Tyr Asp Glu Ala Ile Ala
 245 250 255

Gln Cys Ser Ile Val Leu Ala Glu Glu Glu Asn Asn Val Lys Ala Leu
 260 265 270

25 Phe Arg Arg Gly Lys Ala Arg Ser Ile Leu Gly Gln Thr Asp Ala Ala
 275 280 285

30 Arg Glu Asp Phe Leu Lys Ala Arg Lys Leu Ala Pro Gln Asp Lys Ala
 290 295 300

Ile Thr Arg Glu Leu Asn Leu Ile Ala Glu His Glu Lys Ala Val Tyr
 305 310 315 320

35

<210> 7

<211> 776

40 <212> DNA

<213> Zea mays

<400> 7

45 tttttttttt tttttccccc tagcaacagt attattacta gcataatcta aatatgaaag 60
 ctgcaatata caatggcata aaaggccctt tgagctccag ttgaaagact gtatgaaact 120



atggcataat agtgaacaac atcgtataga gttcataaca actaattgat ccggaccggc 180
 cgacagttct acagaaaatt caacactcct tataatacaa ggttggtcaa ttaggccacc 240
 agttctacac aattttctgg taaattatcc tactcgttct tccgtttgaa catcccagcc 300
 5 agataaagga taaatgacac cagccactgc cagaacacaa cgagggtactt tgccttcttc 360
 gggttcgctt caggacttgg cccaaagaga cctttgtaga gctccttctg cttctgggat 420
 agggccttgn cttgttccgc gagcaaacgg agctcccgaa tgatctcctt gncttctggg 480
 gagtacttct tcgctttgag gaaatcttcc ctcgctgatt ctgtctggcc aagttcagat 540
 ttagcttttc ctgcctgaa cagcgctttg acattacttt catcttctgt caaaacaatg 600
 ctacactgcg caatagcttc atcgaatctc tttagtttga tcaggcatgc ggccatattg 660
 10 agatggcatg gattttttcac agccaaggcc atgtctctgt actttccaaa taattgaaac 720
 atgaaatcat ctcccatgta tgcaatcgcc atttcatatt gctgcatggc ctctc 776

<210> 8

15 <211> 168

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 8

20 Glu Glu Ala Met Gln Gln Tyr Glu Met Ala Ile Ala Tyr Met Gly Asp
 1 5 10 15

Asp Phe Met Phe Gln Leu Phe Gly Lys Tyr Arg Asp Met Ala Leu Ala
 20 25 30

25 Val Lys Asn Pro Cys His Leu Asn Met Ala Ala Cys Leu Ile Lys Leu
 35 40 45

30 Lys Arg Phe Asp Glu Ala Ile Ala Gln Cys Ser Ile Val Leu Thr Glu
 50 55 60

Asp Glu Ser Asn Val Lys Ala Leu Phe Arg Arg Gly Lys Ala Lys Ser
 65 70 75 80

35 Glu Leu Gly Gln Thr Glu Ser Ala Arg Glu Asp Phe Leu Lys Ala Lys
 85 90 95

Lys Tyr Ser Pro Glu Xaa Lys Glu Ile Ile Arg Glu Leu Arg Leu Leu
 100 105 110

40 Ala Glu Gln Xaa Lys Ala Leu Tyr Gln Lys Gln Lys Glu Leu Tyr Lys
 115 120 125

45 Gly Leu Phe Gly Pro Ser Pro Glu Ala Lys Pro Lys Lys Ala Lys Tyr
 130 135 140



Leu Val Val Phe Trp Gln Trp Leu Val Ser Phe Ile Leu Tyr Leu Ala
145 150 155 160

5 Gly Met Phe Lys Arg Lys Asn Glu
165

10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Application No

PCT/DE 00/00506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/29 C12N15/05 C07K14/415 C12N15/82 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAMURA Y: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 3, P1 clone: MIL23" EMBL SEQUENCE DATABASE, 16 November 1998 (1998-11-16), XP002140828 HEIDELBERG DE Ac AB019232 the whole document	1-3
X	ROUNSLEY ET AL.: "F15J23TRB IGF Arabidopsis thaliana genomic clone F15J23, genomic survey sequence" EMBL SEQUENCE DATABASE, 29 May 1998 (1998-05-29), XP002140829 HEIDELBERG DE Ac AQ011048 the whole document	1,2

-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 2000

Date of mailing of the international search report

10/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ceder, 0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00506

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VITTORIOSO ET AL.: "Mutation in the Arabidopsis PASTICCINO1 gene" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 18, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 3034-3043, XP002140830 abstract page 3035	1-7, 11-13
A	VUCICH ET AL.: "Novel structure of high molecular weight FK506 binding protein from Arabidopsis thaliana" MOL GEN GENET, vol. 252, 1996, pages 510-517, XP002140831 abstract; figure 1	3
A	LUAN ET AL.: "Molecular characterization of a FKBP-type immunophilin from higher plants" PROC NATL ACAD SCI USA, vol. 93, July 1996 (1996-07), pages 6964-6969, XP002140832 abstract page 6965	1-5
P,X	ALCALA ET AL. : "Lycopersicon esculentum" EMBL SEQUENCE DATABASE, 15 February 2000 (2000-02-15), XP002140833 HEIDELBERG DE Ac AW441601 the whole document	1,2
P,X	WALBOT V: "Zea mays" EMBL SEQUENCE DATABASE, 13 November 1999 (1999-11-13), XP002140834 HEIDELBERG DE Ac AW171820 the whole document	1,2
P,X	WALBOT V: "Zea Mays" EMBL SEQUENCE DATABASE, 14 December 1999 (1999-12-14), XP002140835 HEIDELBERG DE Ac AW216068 the whole document	1-3

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

In ... des Aktenzeichen

PCT/DE 00/00506

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/29 C12N15/05 C07K14/415 C12N15/82 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAKAMURA Y: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 3, P1 clone: MIL23" EMBL SEQUENCE DATABASE, 16. November 1998 (1998-11-16), XP002140828 HEIDELBERG DE Ac AB019232 das ganze Dokument	1-3
X	ROUNSLEY ET AL.: "F15J23TRB IGF Arabidopsis thaliana genomic clone F15J23, genomic survey sequence" EMBL SEQUENCE DATABASE, 29. Mai 1998 (1998-05-29), XP002140829 HEIDELBERG DE Ac AQ011048 das ganze Dokument	1,2
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Juni 2000

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

10/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ceder, O

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	VITTORIOSO ET AL.: "Mutation in the Arabidopsis PASTICCINO1 gene" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 18, Nr. 5, Mai 1998 (1998-05), Seiten 3034-3043, XP002140830 Zusammenfassung Seite 3035	1-7, 11-13
A	VUCICH ET AL.: "Novel structure of high molecular weight FK506 binding protein from Arabidopsis thaliana" MOL GEN GENET, Bd. 252, 1996, Seiten 510-517, XP002140831 Zusammenfassung; Abbildung 1	3
A	LUAN ET AL.: "Molecular characterization of a FKBP-type immunophilin from higher plants" PROC NATL ACAD SCI USA, Bd. 93, Juli 1996 (1996-07), Seiten 6964-6969, XP002140832 Zusammenfassung Seite 6965	1-5
P,X	ALCALA ET AL. : "Lycopersicon esculentum" EMBL SEQUENCE DATABASE, 15. Februar 2000 (2000-02-15), XP002140833 HEIDELBERG DE Ac AW441601 das ganze Dokument	1,2
P,X	WALBOT V: "Zea mays" EMBL SEQUENCE DATABASE, 13. November 1999 (1999-11-13), XP002140834 HEIDELBERG DE Ac AW171820 das ganze Dokument	1,2
P,X	WALBOT V: "Zea Mays" EMBL SEQUENCE DATABASE, 14. Dezember 1999 (1999-12-14), XP002140835 HEIDELBERG DE Ac AW216068 das ganze Dokument	1-3